

**DOTTORATO DI RICERCA IN ETOLOGIA ED
ECOLOGIA ANIMALE**
(XXIII CICLO-BIO/5)

**Variabilità a loci MHC e scelta sessuale
femminile nel fagiano comune**

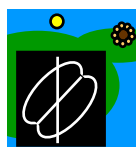
Tesi di
Emanuele Goti



Coordinatore: Prof. Alberto Ugolini

Tutor: Prof. Dessì Francesco

Co-Tutor: Dott.ssa Baratti Mariella



(2010)

**Dottorato in Etologia ed Ecologia animale
(XXIII Ciclo – BIO/5)**

Università degli Studi di Firenze



Facoltà di scienze Matematiche,
Fisiche e Naturali

Dipartimento di Biologia Evoluzionistica
“Leo Pardi”

**Variabilità a loci MHC
e scelta sessuale femminile
nel fagiano comune**

Emanuele Goti

Tutor:

Prof. Francesco Dessì Fulgheri

Co-Tutor:

Dott.ssa Mariella Baratti

Coordinatore del Dottorato:

Prof. Alberto Ugolini



2010

Indice

CAPITOLO 1 INTRODUZIONE

1.1 Descrizione del progetto di ricerca	3
-La specie: il fagiano comune (<i>Phasianus colchicus</i>)	4
-Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC)	6
1.2 Scelta sessuale e diversità ai loci MHC	11
1.3 Effetti del trattamento precoce con testosterone <i>in ovo</i> sui caratteri sessuali secondari e scelta femminile nel fagiano	14
1.4 Scopo della ricerca	17

CAPITOLO 2 CAMPIONE DI STUDIO E MATERIALI E METODI

2.1 Specie oggetto di studio	19
-Misurazione delle caratteristiche fenotipiche dei maschi	19
2.2 Caratterizzazione dei geni MHC: la tecnica CE-SSCP	21
2.3 Analisi dei genotipi MHC	23
-Estrazione del DNA genomico.	24
-Amplificazione del DNA genomico	24
-Analisi dei polimorfismi	26
-Clonaggio dei prodotti di PCR e screening dei cloni	27
-Sequenziamento dei cloni positivi e analisi delle sequenze ottenute	30
2.4 Analisi Statistica	33

CAPITOLO 3 RISULTATI

CAPITOLO 4 DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI

Bibliografia	47
Ringraziamenti	55

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Descrizione del progetto di Ricerca

Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) dei Vertebrati è costituito da un insieme di geni altamente polimorfici, implicati nella regolazione della risposta immunitaria acquisita (Klein, 1986). In virtù dei loro effetti sull'immunità, i geni MHC hanno importanti manifestazioni a livello fenotipico, in quanto possono influenzare lo stato fisiologico degli individui. Specifici profili MHC, che conferissero maggiore resistenza a parassiti e patogeni, potrebbero pertanto fungere da "buoni geni" ed essere associati all'espressione di caratteri sessuali secondari, che costituiscono segnali attendibili di qualità in termini di resistenza a parassiti, come invocato dall'ipotesi di selezione sessuale di Hamilton-Zuk (Hamilton & Zuk, 1982). E' stato osservato che l'espressione di caratteri sessuali secondari è correlata alla presenza di specifici profili MHC in almeno quattro specie di Vertebrati (von Schantz et al., 1994; Ditchkoff et al., 2001; Jager et al., 2007; Baratti et al., 2010).

E' stato anche evidenziato che la scelta femminile, invece di condurre alla selezione di particolari alleli MHC (good genes), può essere indirizzata verso maschi il cui assetto MHC complementi quello femminile (compatible genes), garantendo ad esempio alla prole l'eredità di specifici profili genetici MHC, così da garantire una difesa immunitaria più efficace (Neff & Pitcher, 2005; Milinski, 2006). Inoltre, è stato precedentemente osservato che le condizioni ormonali delle femmine possono modulare la scelta del partner basata sul profilo MHC (Janeway et al., 1999).

In aggiunta al genotipo e agli effetti ambientali diretti, gli effetti materni possono contribuire in maniera sostanziale a delineare il fenotipo della prole (Mousseau & Fox, 1998). Numerosi studi, condotti in prevalenza in Uccelli, hanno dimostrato che le madri possono variare la quantità di ormoni trasmessa alle uova in relazione a stimoli estrinseci ed al proprio stato fisiologico, e che l'esposizione prenatale a queste sostanze può determinare le caratteristiche della progenie (Mousseau & Fox, 1998; Groothuis et al., 2005). La trasmissione di ormoni alle uova potrebbe pertanto consentire alle madri di variare in maniera adattativa il fenotipo della progenie in modo da promuoverne la fitness (Mousseau & Fox, 1998; Groothuis et al., 2005).

Considerando questo quadro di riferimento e partendo da uno stock di fagiani di allevamento, sono state effettuate misure morfometriche e misure comportamentali sia su animali che avevano subito un trattamento precoce *in*

ovo con testosterone che su animali di controllo, in modo da valutare la relazione tra i caratteri morfologici dei maschi con trattamento, rango e scelta sessuale femminile (considerata come il numero di copule). Inoltre dopo aver genotipizzato l'esone 2 della classe IIB dell'MHC è stata indagata la relazione tra gli ornamenti sessuali secondari maschili con la preferenza delle femmine negli accoppiamenti e con l'eterozigosi maschile. Infine, è stato valutato il grado di condivisione allelica tra i partner nella scelta sessuale femminile.

La specie: il fagiano comune (*Phasianus colchicus*)

Il fagiano comune (*Phasianus colchicus*, Linneo, 1758) (Fig.1) è una specie appartenente all'ordine dei Galliformi, alla famiglia Phasianidae e al genere *Phasianus*.



Figura 1 Fagiano comune (*Phasianus colchicus*); (tratto da 'The origin of species illustrated www.theora.com)

Alcuni autori (Vaurie, 1965; Delacour, 1977; Del Hoyo et al., 1994) ritengono che il genere *Phasianus* sia costituito da due specie: il fagiano comune (*Phasianus colchicus*) e il fagiano verde, o giapponese (*Phasianus versicolor*). Alla prima specie appartengono una trentina di sottospecie attribuibili a 5 gruppi sulla base di differenze nella colorazione del piumaggio dei maschi e nella distribuzione geografica: "*colchicus*", "*principalis-chrysomelis*", "*mongolicus*", "*tarimensis*" e "*torquatus*".

L'origine della specie è da situarsi in Asia, nell'area compresa tra il Mar Nero e il Mar Caspio. Attualmente la sua distribuzione è semi-cosmopolita grazie alle introduzioni effettuate dall'uomo nel corso dei secoli negli altri continenti, dall'Europa alle Americhe, all'Australia (Johnsgard, 1999). In Italia, fu introdotto inizialmente dalla Crimea ad opera dei Romani per scopi alimentari ed ornamentali e da allora le immissioni sono continuate in epoche diverse con particolare intensità a partire dalla metà del secolo scorso.

Il fagiano è un uccello caratterizzato da un alto dimorfismo sessuale. La femmina, più piccola del maschio, presenta un piumaggio mimetico di colore bruno chiaro. Il maschio invece è più grande e mostra un piumaggio molto appariscente e colorato: il corpo e la testa sono verdi e blu metallico iridescente e intorno al collo si trova un collare bianco. Il maschio esibisce inoltre un notevole sviluppo degli ornamenti sessuali: una lunga coda (50-60 cm) barrata trasversalmente, delle pennette auricolari poste sulla sommità del capo, le caruncole perioculari e gli speroni tarsali (Fig.2). Le caruncole circondano gli occhi e sono costituite da penne rosse modificate sostenute da tessuto fibromuscolare e tessuto connettivo vacuolizzato che può dilatarsi per irrorazione sanguigna. Gli speroni sono formazioni cornee situate nella parte posteriore dei tarsi.

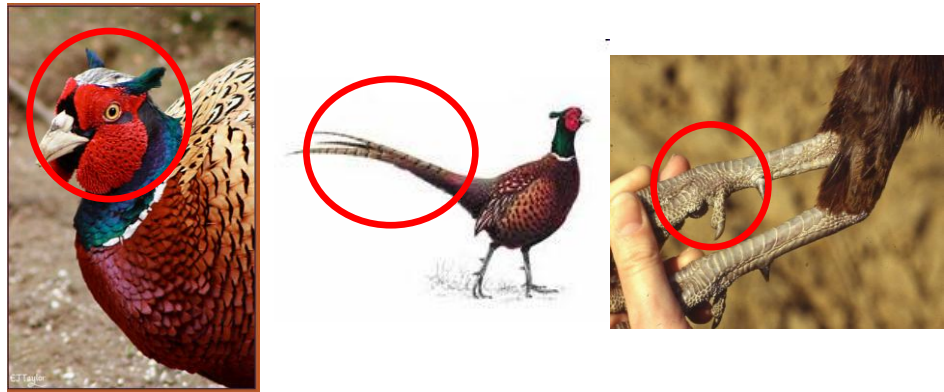


Figura 2 Caratteri sessuali secondari del fagiano comune: a sinistra in evidenza caruncola e pennette auricolari (foto di Taylor E.J.), al centro la coda (da www.rspb.org.uk), a destra lo sperone tarsale.

Il fagiano comune è un animale a sistema nuziale poliginico, con una gerarchia maschile primaverile a tre livelli con maschi territoriali, satelliti e periferici che possono attrarre un numero variabile di femmine nel proprio territorio. Alcuni dei caratteri ornamentali sono condizione-dipendenti e predicono la sopravvivenza e/o il successo riproduttivo, anche se non appare del tutto chiara la distinzione tra selezione inter- ed intrasessuale nell'evoluzione dell'ornamentazione in questa specie (Mateos, 1998).

Tra gli ornamenti del fagiano, la caruncola perioculare sembra essere l'unico carattere sessuale secondario maschile che risente e segnala i livelli di testosterone circolanti (Briganti et al., 1999; Froman et al., 2002). La dimensione della caruncola perioculare misurata all'inizio della stagione riproduttiva, è associata con i livelli di testosterone e potrebbe permettere alle femmine di individuare i maschi migliori e potenzialmente dotati di maggior fitness e con una migliore capacità di resistenza ai parassiti (Mateos, 1998; Papeschi et al., 2000). La caruncola perioculare rappresenterebbe quindi un segnale onesto delle condizioni e della qualità del maschio e potrebbe essere

utilizzato nella scelta del partner. Il testosterone infatti ha una funzione immunosoppressiva: un alto livello di testosterone porta, direttamente o indirettamente, ad una riduzione della efficienza del sistema immunitario e quindi ad una maggior probabilità di contrarre parassiti e malattie (Folstad et al., 1992; Faivre et al., 2003). Di conseguenza, solamente individui dotati di una buona immunocompetenza possono sostenere caratteri sessuali secondari costosi da un punto di vista fisiologico senza subire l'attacco di parassiti e patogeni.

Il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC)

L'origine dei geni MHC (Major Histocompatibility Complex) è chiaramente in relazione con il loro ruolo cruciale nel funzionamento del sistema immunitario dei vertebrati. Negli ultimi anni vi è stato un notevole aumento degli studi sulla organizzazione genomica dei geni MHC nelle differenti classi di vertebrati (Danchin & Pontarotti, 2004; Kasahara et al., 2004; Kelley et al., 2005).

Il sistema immunitario dei vertebrati si basa in larga misura sulle molecole di classe I e II del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), caratterizzate dalla capacità di sviluppare una risposta ad antigeni di origine esogena (principalmente batteri e protozoi) (Fig.3A), o di derivazione endogena (proteine codificate da virus o geni mutati) (Fig.3B) (Jordan & Bruford, 1998).

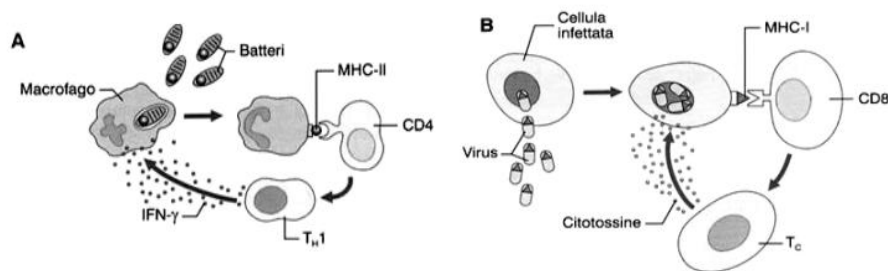


Figura 3 Schema del funzionamento della risposta immunitaria dei Vertebrati verso Batteri (A) e virus (B); da Fisiologia dell'uomo, Edi-ermes, Milano, 2005

Le molecole di istocompatibilità legano l'antigene nel citoplasma di cellule nucleate somatiche o di cellule del sistema immunitario. Da qui, l'antigene viene presentato sulla membrana cellulare per poter essere riconosciuto e distrutto dai linfociti. Le molecole di classe I includono un polipeptide trans-membrana, la catena pesante, che consiste di 5 domini, due dei quali (alfa 1 e alfa 2) sono extracellulari e si legano all'antigene. Le molecole di classe II consistono di due polipeptidi trans-membrana, la catena alfa e beta. La

parte più esterna di questi polipeptidi (alfa 1, e beta 1) forma il sito di legame con l'antigene (Jäger et al., 2007). Le molecole di classe I e II del gruppo maggiore di istocompatibilità sono codificate da numerosi geni del complesso MHC. I geni codificanti per i siti specifici di legame con l'antigene presentano un'enorme variabilità di alleli codominanti. La diversità allelica a livello di popolazione rende possibili migliaia di diverse combinazioni alleliche (naturalmente, per ogni locus, un individuo può ereditare al massimo due alleli) (Jordan & Bruford, 1998; Milinski, 2006). Nell'uomo, per esempio, la probabilità che due individui non imparentati abbiano gli stessi alleli MHC è inferiore a 0.0001, e anche all'interno di individui che appartengono alla stessa famiglia è probabile osservare genotipi diversi. È plausibile che questa diversità si sia evoluta come risposta al grande numero di patogeni che un organismo può incontrare nell'arco della sua vita.

Le molecole dell'MHC sono eterodimeri costituiti da una base (stelo, gambo) con la quale si ancorano alla superficie cellulare, e una parte recettoriale chiamata o PBR (peptide binding region), ARS (antigen recognition site), o APS (antigen presentation site) che rappresenta il sito in cui avviene l'incastro con il peptide antigenico e i vari tipi di linfociti (Fig.4).

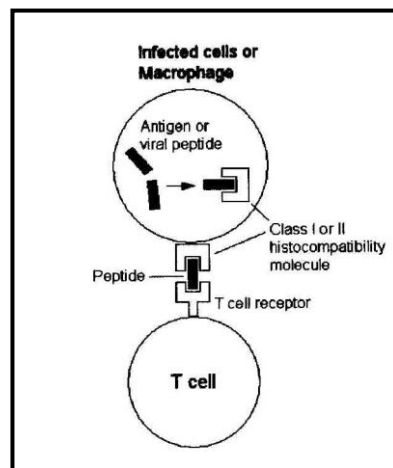


Figura 4 Eterodimero tipico delle molecole I e II dell'MHC

Tanto le molecole di classe I, che quelle di classe II, presentano in queste catene terminali delle “tasche” che corrispondono alla prima e seconda posizione aminoacidica (il sito di ancoraggio) del peptide cui si legano. Si parla di *motivo* per intendere la combinazione di due o più di questi siti sul peptide antigenico ed è stato scoperto che certi alleli di MHC riconoscono motivi simili (Del Guercio et al., 1995; Sette & Sidney, 1998). Di conseguenza si fa riferimento a dei *supertipi* di molecole MHC per indicare quei gruppi di alleli

che riconoscono gli stessi insiemi di motivi. L'importanza della classificazione delle molecole MHC in *supertipi* basata su aspetti strutturali e di specificità peptidica è risultata inizialmente prioritaria nello studio di gravi malattie umane (MacDonald et al., 2000; Balamurugan et al., 2004) e nello sviluppo di farmaci come i vaccini (Sette et al., 2001; Doytchinova & Flower, 2005). Parallelamente, un approccio al MHC come strutturabile in *supertipi* si è affiancato ai metodi standard di analisi allelica e genotipica di questo complesso genico anche in studi di natura diversa, come quelli, in zoologia molecolare, volti a indagare la variabilità genetica e il ruolo del MHC nei meccanismi di scelta sessuale (Penn & Potts, 1999; Schwensow et al., 2007a) e in relazione alla resistenza parassitaria anche in animali diversi dall'uomo (Schwensow et al., 2007b). L'organizzazione interna degli MHC è relativamente costante nelle sue diverse componenti geniche. Nella maggior parte dei casi ogni dominio è codificato da un esone diverso all'interno del gene codificante per quella particolare catena proteica. L'esone 2 del complesso B codificante per la catena beta 1 è uno delle componenti più variabili dei geni MHC di classe II, così come l'esone 3 che codifica per la catena alfa 2 nei geni MHC di classe I. Questo polimorfismo viene mantenuto a livello degli esoni che legano gli antigeni e le loro sequenze sono generalmente utilizzate per determinare il livello di variabilità agli MHC negli studi di genetica di popolazione.

Al mantenimento dell'alto grado di polimorfismo concorrono due meccanismi (Piertney & Oliver, 2006): L'ipotesi della *sovradominanza* (o ipotesi del *vantaggio dell'eterozigote*), proposta inizialmente da Doherty e Zinkernagel (1975) sostiene che l'immunocompetenza sia maggiormente sviluppata negli individui eterozigoti in quanto questi possono riconoscere un più ampio spettro di antigeni derivanti da patogeni, e di conseguenza siano dotati di una fitness relativamente più alta rispetto agli omozigoti e l'ipotesi della selezione da frequenza negativa (o vantaggio dell'allele raro) (Clarke & Kirby, 1966) che suggerisce come il vantaggio selettivo sia a favore di ogni allele nuovo o raro che risponda all'avvento di patogeni insoliti, generando una dinamica coevolutiva tra il genotipo degli ospiti e dei parassiti che risulta, nel tempo, nel mantenimento di un'alta variabilità genetica.

Un ulteriore tipo di meccanismo può operare nella conservazione del particolare livello di polimorfismo dei loci MHC, ed è in relazione con i benefici genetici della selezione sessuale. Anche in questo caso, sono due le possibili ipotesi che diano spiegazione di questo andamento (Penn, 2002). La scelta di un partner piuttosto di un altro sulla base del corredo genetico può infatti essere improntata o alla produzione di una prole che sia dotata di una buona fitness, o essere rivolta a ridurre il più possibile l'insorgere di tutti i rischi che derivano da un elevato tasso di inbreeding tra i riproduttori (Potts & Wakeland, 1990).

Alla luce di questi principali gruppi di teorie che sottostanno alla eccezionale variabilità riscontrata nei geni dell'MHC, una loro integrazione può

essere considerata proprio nell'ottica dei processi di selezione sessuale. Dal momento che i geni dell'MHC manifestano delle espressioni a livello fenotipico (dalla fitness complessiva, alla diversa modulazione di strutture come i caratteri sessuali secondari, agli odori emessi da un individuo) (rev. Tregenza & Wedell, 2000; Zelano & Edwards, 2002; Neff & Pitcher, 2005; Mays & Hill, 2004; Milinski, 2006), in tutti i sistemi riproduttivi in cui la femmina scelga un partner in base a dei benefici indiretti, quali quelli conferiti geneticamente, è plausibile che la scelta venga operata sull'assetto allelico degli MHC, attraverso la valutazione di alcune caratteristiche fisiche del maschio.

In molti studi è stata osservata un'associazione diretta tra genotipi MHC e resistenza ai parassiti o successo riproduttivo (Bernatchez & Landry, 2003). Una buona parte di questi lavori descrivono gli effetti combinati di selezione direzionale e bilanciante che agiscono, durante la storia evolutiva di una specie, sull'insieme di codoni che costituiscono nel loro complesso il sito che lega l'antigene. In maniera simile, gli effetti della selezione positiva durante il periodo di tempo che accompagna l'evoluzione di una specie sono stati evidenziati in moltissimi studi, e si manifestano attraverso la presenza di linee evolutive più antiche della specie dalla quale provengono (i casi di "polimorfismo trans-specifico", Klein, 1987), o gli elevati tassi di sostituzione non sinonima rispetto a quella sinonima (Landry & Bernatchez, 2001; Garrigan & Hedrick, 2003).

MHC del fagiano comune

I geni MHC del Fagiano comune sono altamente polimorfici e costituiti da due gruppi non concatenati, corrispondenti al complesso B e al sistema Rfp-Y del pollo, entrambi con geni della classe MHC I e II (Wittzell et al., 1994; Wittzell et al., 1999). Il Complesso Maggiore di Isocompatibilità (MHC) del fagiano comune contiene tra gli altri due sottofamiglie di geni polimorfici della classe IIB "Phco-DAB1" e "Phco-DAB2" che principalmente differiscono tra loro nella regione (UT) 3'. Questi due loci sembra che si siano evoluti da una duplicazione (Fig.5) avvenuta prima della scissione della linee evolutive che conduce al fagiano e al pollo domestico e sono entrambi espressi (Wittzell et al., 1999)

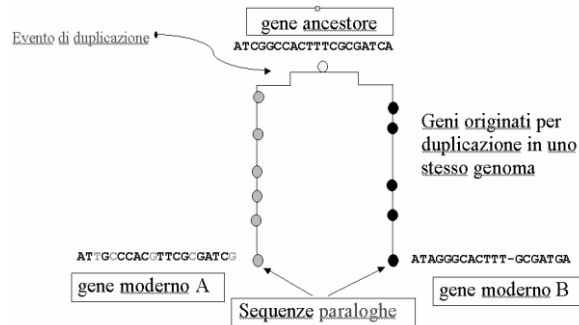


Figura 5 Evento di duplicazione e relativo sviluppo di sequenze paraloghe

La mappa dei loci MHC differisce invece significativamente nelle diverse classi di vertebrati (Kelley et al., 2005) (Fig. 6). I complessi HLA e H-2 in uomo e topo, per esempio, presentano i geni di classe I e II organizzati in cluster distinti ma localizzati nello stesso gruppo di linkage (Kaufman et al., 1990; Trowsdale, 1995). Nei pesci teleostei, invece, i due cluster non sono localizzati nello stesso gruppo di linkage e vengono perciò ereditati indipendentemente (Trowsdale, 1995; Bingulac-Popovic et al., 1997; Sambrook et al., 2002). Una situazione simile si trova anche negli uccelli fino ad ora studiati (due cluster separati per i geni di classe I e II), che presentano geni organizzati in modo più compatto che nei mammiferi (Kroemer et al., 1990; Zoorob et al., 1990; Miller et al., 1994; Trowsdale, 1995).

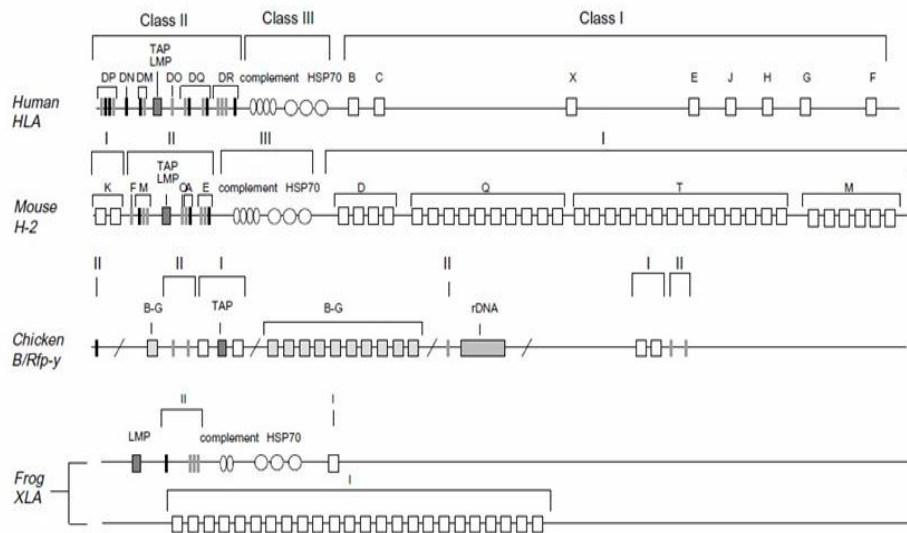


Figura 6 Mappa dei loci MHC in alcune classi di vertebrati: le specie sono indicate a sinistra, i geni e i nomi delle sottofamiglie sono indicate sopra ogni cromosoma come anche le regioni di classe I-III (foto da Edwards & Hedrick, 1998)

1.2 Scelta sessuale e diversità a loci MHC

Il processo della selezione sessuale, proposto da Darwin fra il 1859 e il 1871, favorisce l'aumento della frequenza dei geni che conferiscono un vantaggio riproduttivo all'individuo che li porta (Birkhead & Pizzari, 2002). Darwin fece una chiara distinzione fra selezione naturale e selezione sessuale: se, da un lato, la prima favorisce i caratteri che aumentano la probabilità di sopravvivenza, la seconda, invece, agisce sui caratteri che portano ad un maggior successo riproduttivo di un individuo. La selezione naturale, infatti, non può dar ragione dell'esistenza di caratteri particolarmente appariscenti e a prima vista svantaggiosi per l'individuo che li porta, come ad esempio le corna di molte specie di animali, il palco dei cervi o le enormi dimensioni dei maschi di alcune specie di animali. Per la loro natura, questi caratteri (definiti caratteri sessuali secondari, cioè quei caratteri non strettamente coinvolti nella riproduzione che differiscono fra maschi e femmine) sono svantaggiosi per l'individuo che li porta e dovrebbero venire eliminati dalla selezione naturale. Per spiegare la loro evoluzione, Darwin ha proposto la teoria della selezione sessuale, che prevede che gli individui che portano questi caratteri abbiano un vantaggio rispetto agli altri in termini di un maggior successo riproduttivo (Darwin, 1871).

La selezione sessuale può operare attraverso due meccanismi diversi, ma non mutualmente esclusivi. Da una parte la selezione può favorire i caratteri che aumentano il successo di un individuo nella competizione intrasessuale (la competizione fra i membri di un sesso per la conquista dei membri del sesso opposto). Questo meccanismo porta all'evoluzione di caratteri, detti armamenti, che favoriscono l'individuo nella lotta, come ad esempio corna, zanne, ecc. Il secondo meccanismo della selezione sessuale avvantaggia gli individui più attraenti agli occhi dei membri dell'altro sesso (Andersson, 1994) ed è basato sulla scelta del partner. Questa forma di selezione intersessuale porta alla comparsa di caratteri puramente ornamentali sulla base dei quali viene scelto il partner con cui accoppiarsi. Esempi classici di ornamenti comprendono piumaggi colorati, canti elaborati, ecc. In genere, il sesso che sceglie è quello femminile, mentre quello che compete per l'accesso all'altro sesso è quello maschile. In natura sono presenti anche casi in cui il ruolo dei due sessi è invertito, ma sono in numero estremamente limitato (Andersson, 1994).

Mentre il meccanismo della competizione intrasessuale venne subito accettato dal mondo scientifico, riguardo alla scelta femminile vi fu un ben più lungo e acceso dibattito. Questo meccanismo, infatti, non è stato sperimentalmente dimostrato fino al 1980 (Andersson, 1982). La scelta femminile, infatti, comporta dei costi, fra cui il maggior rischio di predazione a cui le femmine vanno incontro, la spesa energetica per trovare un compagno, il

rischio di contrarre parassiti o di essere ferite. Nonostante questo la scelta femminile è un processo diffuso e ampiamente dimostrato (Andersson, 1994).

Il comportamento di scelta evolve se vi sono dei benefici a compensare i costi sostenuti dalla femmina. Le femmine possono ottenere benefici materiali, come un miglior territorio (associato a maggiori risorse, siti di nidificazione, ecc.), migliori cure parentali da parte del maschio o doni nuziali. La scelta femminile per benefici materiali non costituisce un grande problema teorico ed è facilmente spiegabile dal punto di vista evoluzionistico. In molti sistemi nuziali, però, i maschi non difendono territori, e non contribuiscono all'allevamento della prole tramite cure parentali. In questi casi, la spiegazione della scelta femminile è più complicata ed esistono due modelli principali per spiegarne l'evoluzione e il mantenimento: il modello di Fisher (o runaway selection), che prevede che la scelta femminile sia un processo non adattativo e arbitrario (Fisher, 1930), e il modello genetico dei "good genes" o dei buoni geni, che invece prevede che le femmine ottengano dei benefici di tipo genetico (benefici indiretti) dall'accoppiamento con maschi con caratteri sessuali secondari maggiormente sviluppati (Andersson, 1987).

La scelta del compagno, ed in particolare la scelta femminile, è stata oggetto di ricerche approfondite nel corso degli ultimi due decenni (Andersson & Simmons, 2006). Nella scelta del compagno, se risulta non esserci beneficio diretto per l'individuo o la sua prole, le femmine possono scegliere sulla base dei benefici genetici ereditabili dalla progenie ("good genes hypothesis"). Un buon candidato per studiare questo meccanismo è rappresentato dai geni del Complesso Maggiore di Istocompatibilità MHC (Major Histocompatibility Complex), coinvolto nella resistenza ai parassiti, e in molte altre funzioni.

In questo caso, nell'ottica dell'ipotesi di selezione sessuale proposta da Hamilton e Zuk (Hamilton & Zuk, 1982; Folstad & Karter, 1992), che prevede che i caratteri sessuali secondari maschili segnalino in maniera attendibile la resistenza geneticamente determinata a parassiti e patogeni agendo come segnali condizione-dipendenti, è verosimile attendersi che le femmine, attraverso la scelta sessuale basata su caratteri ornamentali, selezionino specifici profili MHC (Neff & Pitcher, 2005; Milinski, 2006).

Individui con un sistema immunitario particolarmente efficiente possono essere in grado di allocare una maggiore quantità di risorse limitanti allo sviluppo dei caratteri epigamici, e il livello di espressione di tali caratteri potrebbe pertanto segnalare in maniera onesta la qualità individuale, quantomeno in termini di immunocompetenza (Neff & Pitcher, 2005). D'altro canto, la scelta sessuale per un particolare profilo MHC può prescindere dall'espressione di caratteri ornamentali, qualora l'informazione relativa al possesso di un particolare profilo MHC sia veicolata attraverso altre modalità, quali ad esempio segnali di tipo olfattivo, particolarmente diffusi tra Mammiferi e Pesci (Penn, 2002; Milinski, 2006). Evidenze di un coinvolgimento dei geni MHC nella scelta del partner sono state ottenute per praticamente tutte le classi

di Vertebrati (Bernatchez & Landry, 2003). La scelta sessuale relativa ai geni MHC potrebbe essere diretta verso genotipi 'compatibili', in accordo con la "genetic compatibility hypothesis" (Neff & Pitcher, 2005). Questa ipotesi suggerisce che determinate interazioni tra i geni MHC della progenie possano condurre ad un vantaggio in termini di fitness (Neff & Pitcher, 2005; Milinski, 2006). Ciò può verificarsi ad esempio attraverso meccanismi di 'vantaggio dell'eterozigote' (sovradominanza), in quanto una maggiore variabilità ai loci MHC può incrementare la resistenza della progenie alle infezioni (Neff & Pitcher, 2005). Individui eterozigoti infatti sono in grado di produrre un maggior numero di molecole MHC espresse sulla superficie delle loro cellule e possono quindi resistere ad un maggior numero di parassiti rispetto ad individui omozigoti.

Produrre prole con maggiori livelli di eterozigosi può, pertanto, portare ad un aumento della loro probabilità di sopravvivenza e della loro fitness ("heterozygote advantage hypothesis", Potts & Wakeland, 1990; Apanius et al., 1997). Le femmine dovrebbero quindi preferire l'accoppiamento con maschi altamente dissimili a livello genetico, aumentando così l'eterozigosi della prole. Tuttavia, la scelta di compagni geneticamente dissimili può comportare la perdita di adattamenti locali, favorendo la scelta per un compagno con livelli minori di dissimilarità (Bateson, 1983). Sebbene in molti casi sia così (Huchard et al., 2010), in alcune specie è stato dimostrato che la combinazione dei geni materni e paterni può risultare nella scelta di un partner mediamente dissimile ("Optimal Dissimilarity Model", Forsberg et al., 2007). Nello spinarello (*Gasterosteus aculeatus*) in popolazioni naturali la maggior parte dei pesci ha un numero intermedio di alleli MHC classe II fra quelli possibili (Wegner et al., 2003b) ed è stato anche dimostrato che questi individui con un numero intermedio di alleli hanno anche un minor carico di parassiti (Milinski, 2003; Wegner et al., 2003a; Wegner et al., 2003b). In successivi esperimenti, i ricercatori hanno trovato che questo livello ottimale è il risultato della scelta femminile: le femmine non preferivano maschi il più possibile dissimili da loro (Reusch et al., 2001), ma piuttosto sceglievano maschi che fossero complementari (Reusch et al., 2001; Aeschlimann et al., 2003; Eizaguirre et al., 2009). Risultati simili sono stati ottenuti anche per il passero domestico (*Passer domesticus*) (Bonneaud et al., 2004) e per il tacchino (Buccholz et al., 2004).

In ogni caso, la scelta femminile è volta a produrre una prole più resistente e passa attraverso la valutazione di quei caratteri sessuali secondari del maschio che ne riflettono la diversa struttura genotipica e di conseguenza la qualità. In molti studi è stata osservata un'associazione diretta tra genotipi MHC e resistenza ai parassiti o successo riproduttivo (Bernatchez & Landry, 2003), mentre sono al momento pochi i casi che mostrano una chiara correlazione tra il grado di espressione di alcuni ornamenti sessuali del maschio e la sua variabilità a livello del complesso MHC (Von Schantz et al., 1996, 1997; Ditchkoff et al.,

2001; Buccholz et al., 2004; Jäger et al., 2007; Hale et al., 2009; Baratti et al., 2010).

Un solo studio, fin'ora, dimostra come le femmine, preferendo i maschi dotati di ornamenti più vistosi, possano ottenere dei benefici in termini di buoni geni che conferiscono una maggiore resistenza immunitaria e quindi una più alta fitness alla prole che verrà generata (von Schantz, 1997).

In questo senso, l'analisi del polimorfismo dell'MHC nel fagiano comune risulta di particolare interesse. La specie in questione è caratterizzata da un sistema riproduttivo poliginico che la rende un buon modello di studio della scelta sessuale.

1.3 Effetti del trattamento precoce *in ovo* con testosterone sui caratteri sessuali secondari e scelta femminile nel fagiano

Il progetto in cui si inserisce la mia ricerca ha previsto una fase precedente che ha affrontato lo studio dell'influenza del trattamento precoce con testosterone (*in ovo*) sul comportamento del maschio, la sua morfologia e sulla scelta sessuale della femmina (per dettagli sull'analisi statistica vedi Bonisoli et al., 2010). Da questo studio è emerso che i maschi trattati (maschi-T), non differivano nel numero di interazioni vinte rispetto ai maschi di controllo (maschi-C) ($p = 0.84$; maschi-C: 44.29 (10.61); maschi-T: 40.00 (7.67)) e neppure nel numero di interazioni perse ($p = 0.89$; maschi-C: 5.90 (0.87); maschi-T: 6.00 (0.80)).

Il rango dei maschi non era influenzato dal trattamento ($p = 0.734$).

Sono state osservate in totale 685 copule: 95 femmine su 108 e 41 maschi su 42 sono stati visti copulare almeno una volta. Analizzando solo il trattamento maschile si è visto come i maschi-T copulano un numero di volte maggiore dei maschi-C considerando l'insieme delle femmine trattate e non trattate ($p=0.012$) (Tab.1).

Variabile	Coefficiente	P _{rand}
Trattamento ♂	0.097	0.012
Trattamento ♀	-0.019	0.295
Trattamento ♂ x Trattamento ♀	-0.079	0.014

Tabella 1 Effetto del trattamento *in ovo* sul numero di copule. (per dettagli vedi Bonisoli et al., 2010)

Prendendo come variabile solo il trattamento femminile invece, si nota che le femmine trattate (femmine-T), considerando l'insieme dei maschi, copulano un numero non diverso di volte rispetto alle femmine non trattate (femmine-C) (Tab.1).

Infine, considerando l'interazione significativa tra il trattamento maschile e quello femminile, si può affermare che:

1) Femmine-T copulano un numero di volte inferiore rispetto alle femmine-C

$$\text{♀-(T)} \xrightarrow[\text{num. di Copule}]{} \text{♀-(C)}$$

Mann-Whitney U test: $Z = -2.97, p = 0.003$

2) Femmine-C copulano più frequentemente con i maschi-T rispetto ai maschi-C

$$\text{♀-(C)} \xrightarrow[\text{num. di Copule}]{} \text{♂-(T)}$$

Mann-Whitney U test: $Z = -2.42, p = 0.016$

In una serie supplementare di analisi, è stato considerato ogni carattere morfologico maschile e il rango, da soli o in relazione con il trattamento dei maschi per saggiare così la preferenza femminile (Tab.2).

Da questa analisi si osserva che la scelta femminile del compagno non dipende, né dall'espressione dei caratteri sessuali maschili (sia ordinari che secondari), né dal rango maschile (Tab.2).

Variabile	Coefficiente	P _{rand}
Lunghezza Tarso	4.4×10^{-4}	0.229
Lunghezza Tarso x trattamento ♂	0.002	0.094
Massa corporea	-4.7×10^{-5}	0.371
Massa corporea x trattamento ♂	-1.8×10^{-4}	0.319
Lunghezza Sperone	0.012	0.137
Lunghezza Sperone x trattamento ♂	-0.031	0.113
Ciuffi Auricolari	-1.6×10^{-5}	0.487
Ciuffi Auricolari x trattamento ♂	-0.020	0.797
Area Caruncola	0.022	0.233
Area Caruncola x trattamento ♂	0.039	0.260
Brillantezza Caruncola	-1.115	0.218
Brillantezza caruncola x trattamento ♂	1.019	0.366
Saturazione Caruncola	0.350	0.304
Saturazione Caruncola x trattamento ♂	-0.665	0.676
Tonalità Caruncola	0.017	0.511
Tonalità Caruncola x trattamento ♂	-0.311	0.423
Rango	-0.006	0.126
Rango x trattamento ♂	0.007	0.246

Tabella 2 Caratteri sessuali secondari e ordinari in relazione alla scelta femminile al trattamento con testosterone *in ovo*.

Quindi, sia gli ornamenti maschili, che il rango, di per se o in combinazione con il trattamento delle uova, non sono in relazione con le preferenze delle femmine negli accoppiamenti (vedi Bonisoli-Alquati et al., 2010).

1.4 Scopo della Ricerca

Obiettivo della presente ricerca è stato quello di indagare le relazioni tra profilo MHC, effetti materni mediati da androgeni e la scelta sessuale femminile nel fagiano comune (*Phasianus colchicus*).

È plausibile che gli androgeni contenuti nelle uova, influenzando la risposta immunitaria e l'espressione dei caratteri sessuali secondari, possano interferire con il genotipo MHC nel determinare fenotipo e attrattiva sessuale.

La caratterizzazione dei profili MHC degli individui di entrambi i sessi può permettere di capire se la scelta sessuale femminile sia MHC-dipendente o se sia basata sul genotipo dei maschi. È importante sottolineare che non esistono studi riguardanti la scelta sessuale femminile diretta per maschi dotati di particolari ornamenti mediata dal genotipo MHC.

A questo scopo ho analizzato:

- 1) i profili MHC dei maschi e delle femmine coinvolti negli accoppiamenti.
- 2) gli effetti della manipolazione sperimentale dei livelli di testosterone *in ovo* sulla scelta femminile mediata dal profilo MHC.
- 3) la correlazione del profilo MHC del maschio e scelta femminile con i caratteri sessuali secondari e ordinari.
- 4) la relazione tra profili MHC e scelta femminile.

CAPITOLO 2

CAMPIONE DI STUDIO e MATERIALI E METODI

2.1 Specie oggetto di studio

Il progetto è realizzato analizzando uno stock di ca. 400 fagiani di allevamento, metà dei quali originati da uova inoculate con testosterone (T) e metà originati da uova di controllo (C), inoculate con il solo solvente dell'ormone, nel corso della primavera del 2008. Questi animali sono stati stabulati presso un allevamento in provincia di Milano. La manipolazione ha previsto l'innalzamento della concentrazione di T nelle uova pari ad 1 deviazione standard dalla media. Il successo di schiusa delle uova inoculate è risultato molto elevato (85%), senza differenze tra i trattamenti sperimentali. Non si è osservata alcuna mortalità differenziale tra i trattamenti o tra i due sessi. Gli animali sono stati individualmente marcati e sono stati mantenuti in ampie voliere. (Bonisoli-Alquati et al., 2010).

Misurazione delle caratteristiche fenotipiche dei maschi

All'età di 270 giorni sono stati misurati i caratteri sessuali secondari e ordinari di 92 maschi (43 controlli e 49 provenienti da uova iniettate con testosterone) e di 108 femmine (55 controlli e 53 nate da uova trattate con testosterone), scelte a caso dal pool originale di individui. In particolare è stato analizzato:

- 1) Massa corporea e lunghezza del tarso; è stata utilizzata una bilancia a molla (5g) e un calibro digitale (0,01 mm).
- 2) Lunghezza dello sperone destro e pennette auricolari dell'orecchio destro, usando rispettivamente un calibro digitale ed un righello (0,05 mm).
- 3) la dimensione della caruncola a partire da una foto digitale ottenuta tramite una canon EOS 30D (Canon inc., Japan) munita di un obiettivo Canon 18-55 mm, impostata su una lunghezza focale di 35mm. E' stata stimata l'area rossa carnosa della caruncola misurando il numero dei pixel dell'immagine digitale ("Lasso tool" in adobe Photoshop R CS2) e trasformandolo in una misura di superficie (cm²) facendo riferimento al righello fotografato con l'animale (Rubolini et al., 2006).

E' stato valutato il colore della caruncola in un range di 300-700 nanometri utilizzando uno spettrometro portatile (Avantes AvaSpec 2048,

Netherlands) collegato ad una lampada alogena al deuterio (Avantes DH-2000). Le misure di riflettanza sono state usate per calcolare la tinta, la brillantezza e la saturazione in accordo con Endler (1990).

Dei 92 maschi misurati, ne sono stati scelti a caso 42 (21 controlli e 21 trattati con Testosterone). Questi individui sono stati divisi in 3 gruppi di 14 maschi ciascuno (7 controlli e 7 maschi trattati con testosterone).

Successivamente ogni gruppo è stato trasferito in alcune voliere in cui una settimana prima erano state trasferite le 108 femmine (inizio della seconda metà di Marzo). Nei fagiani, il massimo livello di aggressione si manifesta a Marzo-Aprile, quando la territorialità è stata già stabilita (Cramp, 1998). La sex-ratio all'interno di ogni voliere era compatibile con le dimensioni degli harem in condizioni naturali (1-8 femmine per maschio, occasionalmente fino a 18 femmine) (Ridley & Hill, 1987; Hill & Robertson, 1988).

Cibo e acqua erano forniti ad libitum. Tra i maschi dei 3 gruppi, così come tra i maschi controllo e maschi trattati con testosterone, non vi erano particolari differenze per quanto riguarda la lunghezza del tarso, massa corporea, condizioni fisiche generali e l'espressione dei tratti sessuali secondari.

Le osservazioni comportamentali sono iniziate due giorni dopo aver trasferito i maschi nelle voliere lasciando così loro il tempo di acclimatarsi e stabilire i territori.

Ogni gruppo di maschi è stato osservato per 6 ore dalle 7:30 a.m. alle 01:30 p.m. per 5 giorni consecutivi. Due osservatori, nascosti ai lati opposti della voliera, hanno raccolto tutte le interazioni tra coppie di maschi annotando l'identità di ogni maschio coinvolto e classificandoli così come vincenti o perdenti in ogni interazione. Il vincente e il perdente venivano facilmente individuati in quanto il maschio vincente iniziava la tipica interazione agonistica minacciando, beccando ed inseguendo l'altro maschio che reagiva ritraendosi o scappando (Mateos & Carranza, 1997). Ogni interazione veniva considerata conclusa quando il vincitore smetteva di inseguire e beccare il perdente.

E' stata registrata l'identità di entrambi i maschi e il risultato delle interazioni in un totale di 1767 casi. Il numero totale di interazioni vinte da ogni individuo, così come il numero di maschi sconfitti, sono stati successivamente utilizzati per comparare i maschi dei due trattamenti.

I risultati di ogni coppia di combattimenti sono stati utilizzati per calcolare il rango individuale di ogni maschio all'interno del proprio gruppo (attraverso l'indice di David) (David, 1987)

E' stato inoltre identificato il numero di partecipanti di tutte le copule che sono avvenute durante il periodo di osservazione e sono state considerate solo le copule in cui la femmina si presentava al maschio in posizione accovacciata

(ovvero quando la femmina presentava un comportamento di accettazione della copula). Coerentemente con quanto detto, l'atteggiamento della femmina durante la copula, è stato interpretato come un comportamento di scelta.

2.2 Caratterizzazione dei geni MHC: la tecnica CE- SSCP

La tecnica “Single strand conformation polymorphism” (SSCP) originariamente descritta da Orita et al. (1989), Inazuka et al. (1997), Atha et al. (1998), Wenz et al. (1998), si basa ad oggi sulla separazione elettroforetica su Sequenziatore automatico (ABI Prism 310), di singoli filamenti di DNA (Kourkine et al., 2002) (Fig.7). Viene sfruttata infatti la qualità della singola elica di DNA che, in ambiente non-denaturante e a basse temperature, assume una precisa conformazione tridimensionale che dipende soltanto dalla precisa sequenza nucleotidica.

Questo significa che anche singoli cambi di basi possono causare variazioni di conformazione della struttura secondaria (molecola 3D) del DNA. Di conseguenza diverse conformazioni dovute a differenti sequenze nucleotidiche, risulteranno avere una differente mobilità nella corsa elettroforetica (Fig.7).

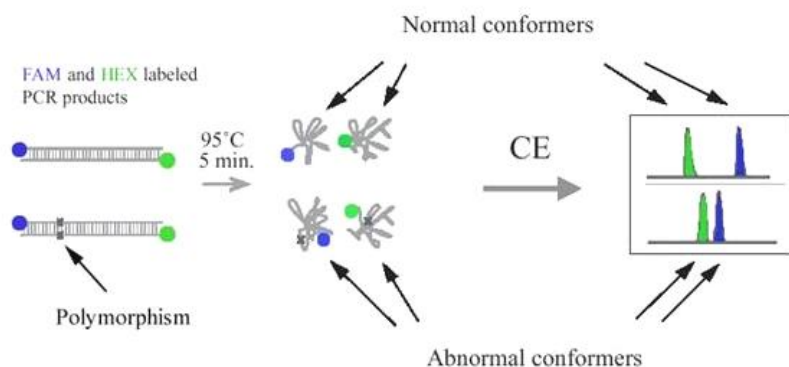


Figura 7 Principio di funzionamento della tecnica “Capillary Electrophoresis-Single strand conformation polymorphism” (tratto da Andersen et al., 2003)

Oltre a risultare un sistema economico e semplice, grazie soprattutto al passaggio alla corsa elettroforetica su capillare, è un metodo che risulta particolarmente adatto per lo screening di mutazioni puntiformi, permette di rivelare locus singoli o loci multipli, ed infine è un indicatore codominante, cioè

permette di differenziare omozigoti da eterozigoti, in base ai diversi output visualizzati (Fig.8).

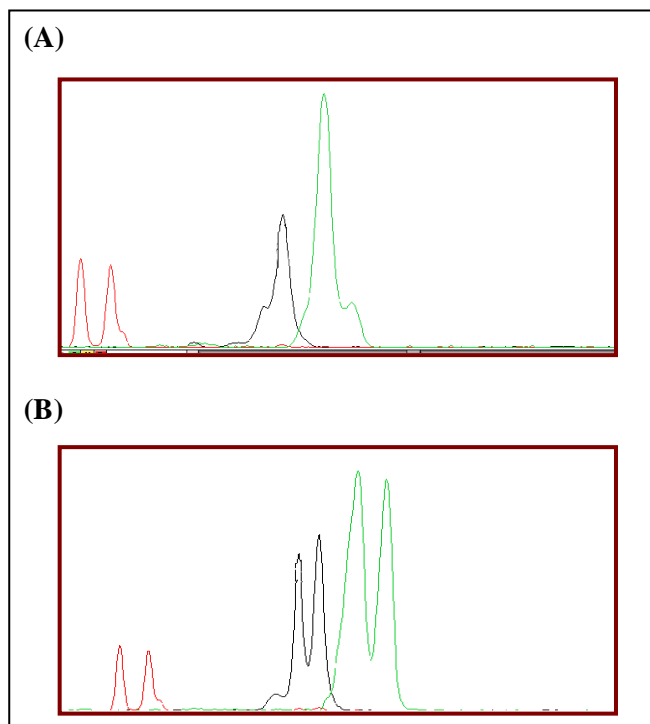


Figura 8 Tipici esempi di profili SSCP: omozigoti (A) ed eterozigoti (B)

Sotto condizioni ottimali (temp k, lunghezza del frammento < 300bp), questa tecnica può arrivare a mostrare l'80-90% dei potenziali cambi nucleotidici.

In questo lavoro abbiamo così adottato questa tecnica per lo studio della caratterizzazione genotipica e allelica dell'MHC del fagiano comune (*Phasianus colchicus*), visto che ben si adattava anche alle piccole dimensioni dell'amplicone caratterizzato (sezione dell'esone 2 della classe IIB) di 220pb.

2.3 Analisi dei genotipi MHC

La caratterizzazione della variabilità MHC in *Phasianus colchitus* ha previsto l'analisi di una porzione dell'esone 2 del locus MHC classe IIB compresa tra i codoni 17 e 91, contenente 21 siti che codificano per i recettori che legano l'antigene (PBR, *Protein Binding Region*). L'esone 2 del complesso B codifica per la catena $\beta 1$ e rappresenta la parte più variabile dei geni MHC di classe II, per questo è comunemente utilizzato nelle analisi di genetica di popolazione. Il protocollo di tipizzazione degli individui consisteva in: estrazione del DNA genomico, amplificazione mediante PCR del locus considerato, visualizzazioni dei prodotti PCR con il sistema elettroforetico CE-SSCP che permette la determinazione del livello di polimorfismo interindividuale, nonché lo screening di omozigoti ed eterozigoti. I primi sono stati sequenziati direttamente, mentre gli eterozigoti sono stati clonati e successivamente sequenziali (Fig. 9).

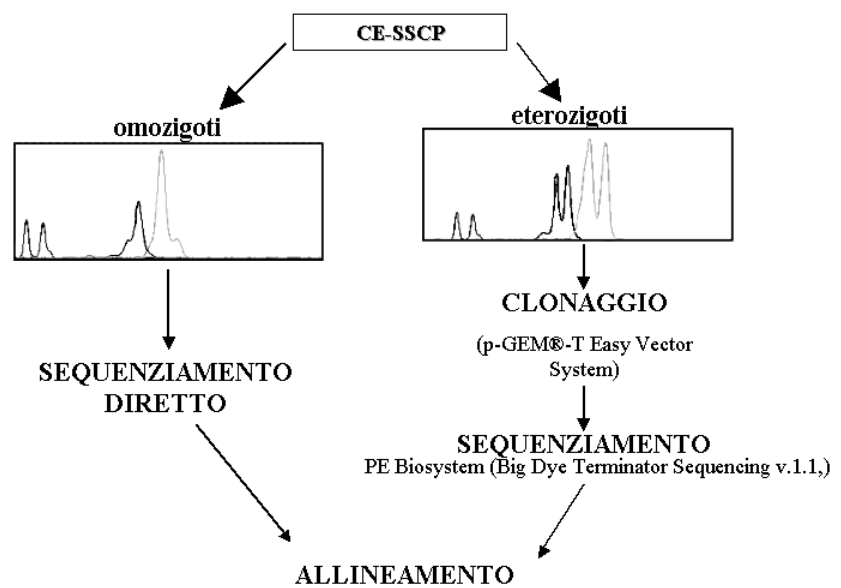


Figura 9 Le varie fasi relative allo screening dei profili MHC.

Estrazione del DNA Genomico

Campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena alare di 151 animali (108 femmine e 43 maschi) usando una soluzione EDTA 0,25M come anticoagulante. I campioni sono stati poi lasciati a -80°C fino all'estrazione del DNA. L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il kit Puregene DNA isolation D-5000A (Gentra Systems, Minneapolis, USA) presente in commercio, seguendo il protocollo disegnato dalla ditta stessa per l'estrazione da sangue di non-mammiferi (invertebrati, rettili, pesci, uccelli) che di seguito è riportato.

Lisi cellulare. Dopo aver scongelato il sangue conservato in EDTA, sono stati posti 6µl in una provetta *ependorf* da 1.5ml contenente 300µl di *Cell Lysis Solution*, mescolando con la pipetta 3-5 volte per lisare le cellule.

Precipitazione delle proteine. Dopo aver incubato il campione in ghiaccio per 10 minuti, sono stati aggiunti 100µl di *Protein Precipitation Solution*. Il campione è stato vortexato alla massima velocità per 20 secondi, per mixare in maniera uniforme la soluzione con il lisato cellulare, e centrifugato alla massima velocità per 4 minuti. Le proteine hanno così formato un pellet compatto.

Precipitazione del DNA. Sono stati prelevati 180µl di supernatante contenente il DNA (lasciando il pellet di proteine precipitare) e posti in una provetta da 1.5ml contenente 300µl di isopropanolo al 100%. Il campione è stato mixato invertendo lentamente per 50 volte e centrifugato alla massima velocità per 2 minuti: il DNA si è reso visibile come un piccolo pellet bianco. È stato prelevato il supernatante e si è fatta sgocciolare la provetta su carta assorbente. Sono stati aggiunti 300µl di etanolo al 70% e è stata invertita la provetta più volte per lavare il pellet di DNA. E' stato centrifugato alla massima velocità per 1 minuto ed è stato tolto l'etanolo facendo attenzione a non rimuovere anche il pellet di DNA. La provetta è stata posta a sgocciolare su carta assorbente pulita e si è lasciato asciugare il campione all'aria per 10-15 minuti.

Idratazione del DNA. Sono stati aggiunti 50µl di *DNA Hydration Solution* ed il DNA è stato fatto reidratare per 1 ora nel termostato a 65°C.

Amplificazione del DNA Genomico

L'amplificazione dell' esone 2 del locus MHC classe II β è stata ottenuta tramite PCR come in Wittzell et al. (1994).

Questa tecnica consiste nella creazione di molte copie di un tratto di DNA in una soluzione tampone contenente l'enzima DNA Polimerasi, gli oligonucleotidi innesci (primers), i quattro deossinucleotidi di cui è composto il DNA, e il cofattore MgCl₂ a passaggi alternati a temperature diverse. Il

campione di DNA stampo che si vuole amplificare viene denaturato, mediante aumento della temperatura, e poi raffreddato per permettere agli inneschi di legarsi ai filamenti singoli (annealing). Successivamente la temperatura viene innalzata nuovamente e la taq polimerasi catalizza la sintesi dei filamenti di DNA complementari mediante aggiunta dei deossinucleotidi. Questo ciclo viene in genere ripetuto 30-40 volte e il metodo è detto “a catena” perché i prodotti di ciascuna reazione vengono usati come filamenti stampo nelle reazioni successive(Fig.10).

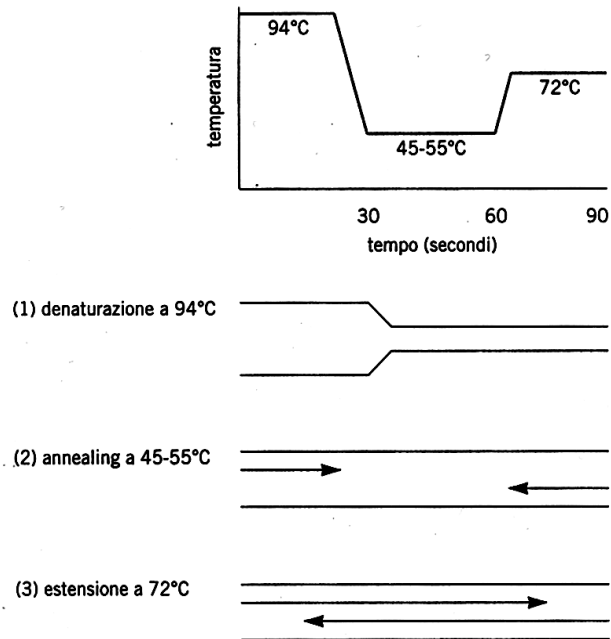


Figura 10 Principio di funzionamento della PCR per l'amplificazione del DNA

Abbiamo utilizzato la coppia di primers B44 (forward primer) e DR1 (reverse primer) (Wittzell et al., 1994).

B44

(5'ACCCAGCAGGTGAGGCATGTG), complementare all'estremità 5'

DR1

(5'GCTCCTCTGCACCGTGAAGGA), complementare all'estremità 3'

I frammenti sono stati amplificati su una macchina Perkin Elmer 9700. L'amplificazione ha avuto luogo in un volume totale di 25 µl, contenente una concentrazione finale di:

- 0.5 μ M di ciascun primer;
- 200 μ M di dNTPS;
- Buffer di reazione (10X PCR buffer sprovvisto di MgCl₂);
- 1.5 mM di MgCl₂ (50mM);
- 1-2.5 unità di Taq polimerasi (5 U/ μ l) (Invitrogen).

Il profilo della PCR consisteva in un passaggio iniziale a 95°C di 5 minuti seguito da 40 cicli di amplificazione con il profilo 95°C (fase di denaturazione), 62°C (fase di annealing) , 72°C (fase di estensione) di 45 secondi ciascuno. Ciascuna serie di cicli iniziava con 5 minuti a 95°C e terminava con 10 minuti a 72°C (Fig.10).

Tutte le reazioni di PCR prevedevano anche un controllo negativo senza DNA, per verificare l'assenza di contaminazioni nei reagenti che avrebbero potuto falsare l'interpretazione dei risultati. I prodotti di amplificazione risultati sono di circa 220 paia di basi e sono stati risolti con un gel di agarosio all'1,5% in tampone TEA 1x (Tris Base, acido acetico, EDTA, pH 8.0).

Analisi dei polimorfismi

L'analisi dei polimorfismi è stata condotta utilizzando la tecnica di separazione elettroforetica su capillare CE-SSCP.

I campioni sono preparati come segue: sono stati aggiunti ad 1 μ l di prodotto PCR, 10.5 μ l di formamide e 0.75 μ l di GeneScan Standard ROX 500; dopo il passaggio in denaturazione per 3 minuti a 94°C immediatamente il tutto è stato posto in ghiaccio per ulteriori 2 minuti. L'intera mix è stata così caricata su un capillare di 47 cm di lunghezza e 50 μ m di diametro, riempito di un polimero contenente 10% glicerolo e 1X di AB Buffer 310 la cui concentrazione è stata testata al 3% e al 4%, e su cui è stata effettuata la corsa elettroforetica.

La combinazione di condizioni di elettroforesi che si è rivelata funzionare a livelli ottimali dando una migliore separazione dei picchi è stata la seguente: tensione di 15 kV EP e concentrazione del polimero al 4% , 30 ° C di temperatura (25 min).

Abbiamo utilizzato primers marcati all'estremità 5' per entrambi i filamenti del DNA, con 2 diverse colorazioni (HEX per il forward e 6-FAM per il reverse) per consentire la differenziazione dei due filamenti singoli. Da questo screening abbiamo selezionato gli individui che si sono rivelati essere omozigoti che sono stati sequenziati direttamente utilizzando il kit di sequenziamento della PE Biosystem (Big Dye Terminator Sequencing v.1.1.). Abbiamo poi scelto eterozigoti diversi, e li abbiamo clonati utilizzando il kit pGEM ®-T Easy Vector System (Promega). Le sequenze clonate sono state nuovamente corse con CE-SSCP come controllo. Tutte le sequenze sono state allineate e confrontate con quelle già descritte in precedenza per la stessa specie

(Wittzell et al., 1994; von Schantz et al., 1996). Tutte le analisi CE-SSCP e il sequenziamento sono state eseguite sul sequenziatore ABI Prism 310 ® automatizzato. Per visualizzare i profili CE-SSCP è stato utilizzato il software GeneScan versione 3.7 (PE Applied Biosystems™).

Clonaggio dei prodotti di PCR e screening dei cloni

Una volta ottenuto il prodotto di PCR si è proceduto al clonaggio degli individui con profili SSCP eterozigoti, utilizzando il kit pGEM ®-T Easy Vector System (Promega). Il clonaggio permette di separare i diversi alleli di un dato gene proveniente da un individuo eterozigote e conoscerne l'esatta sequenza (che altrimenti non sarebbe riferibile).

La tecnica del clonaggio ha permesso di ottenere numerose copie identiche di uno o più frammenti specifici di DNA, ma, a differenza della PCR, in questo caso viene sfruttato il meccanismo di replicazione del DNA all'interno delle cellule batteriche (duplicazione del DNA in vivo). I batteri, infatti, come tutte le cellule viventi, sono dotati di un menoma che si presenta sotto forma di uno o più cromosomi circolari o più raramente lineari, le cui dimensioni variano da circa 500.000 a 8.000.000 di paia di basi. Oltre a questo cromosoma, in cui sono presenti tutti i geni necessari per lo sviluppo e la sopravvivenza della cellula stessa, molto spesso i batteri possono avvalersi dell'informazione genetica codificata in geni supplementari, che sono presenti su molecole chiamate plasmidi.

I plasmidi sono a loro volta molecole circolari di DNA. Le dimensioni sono generalmente molto minori rispetto al cromosoma batterico (alcune migliaia di paia di basi); inoltre, a differenza del cromosoma, possono, in determinate condizioni, essere scambiati tra una cellula e l'altra. Quando, prima della divisione cellulare, la cellula batterica copia il suo materiale genetico, viene duplicato sia il cromosoma batterico sia gli eventuali plasmidi presenti al suo interno. Un plasmide presenta, quindi, tutte le caratteristiche necessarie per poter essere considerato un ottimo 'vettore di clonaggio'; inserendo, infatti, un frammento di DNA esogeno all'interno di un plasmide, e inserendo tale plasmide all'interno di una cellula batterica (solitamente l'enterobatterio *Escherichia coli*), otterremo, ad ogni ciclo di duplicazione del batterio, molte copie del frammento inserito. Considerato che il ciclo riproduttivo di un batterio è solitamente di circa 30 minuti, questo ci permette di ottenere in poche ore un numero elevatissimo di copie di un frammento di interesse (Fig.11).

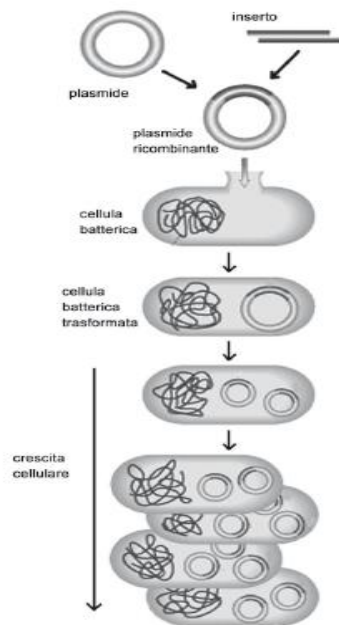


Figura 11 Principio di funzionamento della tecnica del clonaggio (da Scialpi & Biondi, 2008).

Dopo aver verificato l'effettiva amplificazione, i campioni sono stati purificati con la soluzione Sure Clean (Bioline), seguendo il protocollo fornito dal produttore.

Per poter procedere al clonaggio è stata prima calcolata la quantità di prodotto PCR purificato, necessaria per la fase di ligazione. Il kit è stato ottimizzato usando un rapporto della molarità inserto-vettore pari a 1:1, nel nostro caso valori ottimali sono stati ottenuti con rapporto 3:1. Per calcolare la quantità appropriata di prodotto PCR purificato è stata adottata la seguente formula:

$$\frac{\text{ng (del vettore)} \times \text{kb}}{\text{(lunghezza dell'inserto)}} \times \text{INSERT:VECTOR MOLAR RATIO} = \text{ng dell'inserto}$$

Kb (lunghezza del vettore)

Il vettore fornito dal kit è all'incirca di 3kb in 50 ng/ µl e il nostro inserto è di circa 220 bp, quindi:

$$\frac{50 \text{ ng (del vettore)} \times 0.22 \text{ kb}}{0.3 \text{ Kb (lunghezza del vettore)}} \times \frac{3}{1} \text{ (INSERT:VECTOR MOLAR RATIO)} = 11 \text{ ng di inserto}$$

La quantità di 11 ng doveva essere in un massimo di 3 µl totali. Prima è stato quantizzato così il campione con fluorimetro QubitTM (Invitrogen) utilizzando il Quant-it dsDNA Assay Kit (Invitrogen) per poter fornire gli 1-3 µl del complessivo 11 ng, ottenuti dalla proporzione:

Quantità quantizzazione con fluorimetro(ng/µl): $1=11(\text{ng}): \text{Campione X}$

I 3 µL totali (prodotto PCR + eventuale dH₂O) sono stati ligati con 5 µl di buffer 2X , 1 µl del vettore (pGem) e 1 µl dell'enzima ligasi (T4Dna). Le provette sono state quindi incubate a 4°C per tutta la notte.

Il vettore utilizzato in questo kit è il “pGEM-T Easy Vector” (Promega), un vettore linearizzato di lunghezza pari a 3015 paia di basi. Come altri vettori utilizzati per il clonaggio esso presenta dei frammenti di restrizione, un gene che conferisce resistenza all'antibiotico Ampicillina e il gene LacZ, all'interno del quale è inserito il polilinker. E' pertanto possibile eseguire la selezione dei cloni positivi sulla base di una reazione colorimetrica (bianco-blu) mediata dall'analogo del galattosio X-Gal.

Il giorno successivo si sono aggiunte a ciascuna provetta 40 µl di cellule competenti (*E. coli*, fornite nel kit), e sono state poi lasciate in ghiaccio per 20 minuti. A questo punto si è provveduto allo shock termico a 42°C per 45-50 secondi, dopodichè le provette sono state di nuovo riposte in ghiaccio per due minuti.

E' stato poi aggiunto il SOC (2% bacto triptone, 0.5% estratto di lievito, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosio) per indurre la trasformazione e le cellule sono state lasciate crescere per 90 minuti a 37°C in agitazione a circa 150 rpm.

Aliquote di batteri (50 µl e 30 µl) sono state successivamente distribuite su piastre Petri di 9 cm di diametro (previste due piastre per ciascun campione), contenenti 25 ml di terreno LB (bacto triptone 10 g/l, estratto di lievito 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7) agarizzato (15 g/l) a cui sono stati aggiunti 100 mg/l di antibiotico di selezione (Ampicillina) e i substrati di reazione per l'enzima β-galattosidasi: IPTG (isopropil-tiogalattoside; analogo del lattosio) 100 mM e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galattoside; substrato cromogeno della β-galattosidasi) 50 µg/ml, sciolto in dimetilformammide, DMF. Le cellule sono state lasciate crescere a 37°C overnight. Le colonie batteriche risultate positive (ovvero quelle che hanno incorporato il vettore ricombinante e che pertanto presentano colorazione bianca) (Fig.12), sono state poi piccate e strisciate su una nuova piastra su cui era stata disegnata una griglia, al fine di ottenere un'ulteriore selezione. Le cellule sono state nuovamente lasciate crescere a 37°C overnight.

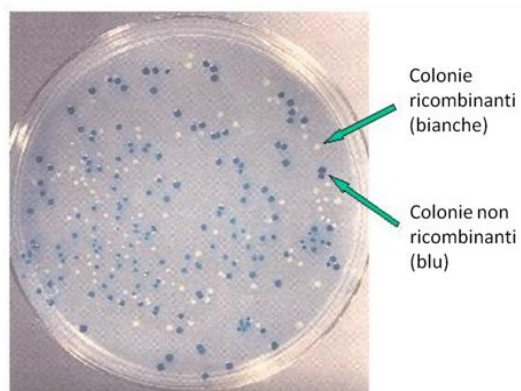


Figura 12 Crescita di colonie positive (con vettore ricombinante) e negative (di colore blu)

La mattina successiva le colonie batteriche cresciute sulla piastra con la griglia sono state piccate, risospese in 20 μ l di acqua distillata, e poi amplificate su una macchina Perkin Elmer 9700 in un volume totale di 20 μ l contenente 0.5 μ M di ciascuno dei primers SP6 e T7 del vettore, 0,2 mM di ciascun dNTP (10mM), Buffer di reazione (10X PCR buffer sprovvisto di MgCl₂), 1,5 mM di MgCl₂ (50mM), 1.0-2.5 unità di Taq polimerasi (5 U/ μ l) (Invitrogen).

Il profilo di PCR utilizzato per l'amplificazione dei cloni prevedeva un passaggio iniziale a 95°C per 10 minuti, 35 cicli composti da 95°C (fase di denaturazione), 50°C (fase di annealing) e 72°C (fase di estensione) di 30 secondi ciascuno, seguito da un ultimo passaggio a 72°C per 10 minuti. Il prodotto di PCR è stato risolto su gel di agarosio 1,5% in tampone TEA 1X.

Sequenziamento dei cloni positivi e analisi delle sequenze ottenute

Il sequenziamento del DNA è una procedura che ha come scopo quello di determinare l'esatta sequenza dei nucleotidi componenti l'acido nucleico.

E' necessaria una preparazione preliminare del campione di DNA di cui si vuole ottenere la sequenza nucleotidica, tramite una reazione particolare di PCR, detta "PCR di sequenza" o "Cycle sequencing". Successivamente avviene la fase di rilevazione della sequenza mediante il sequenziatore di DNA, che permette la ricostruzione della sequenza nucleotidica. I reagenti implicati nella reazione di sequenza sono gli stessi della PCR, anche se la reazione di sequenza non comporta un'amplificazione esponenziale ma lineare. Infatti, la DNA

polimerasi sintetizza nuovi filamenti del DNA iniziale in una sola direzione, quella dell'unico primer fornito nella miscela di reazione.

La differenza fondamentale è però data dalla presenza, oltre che dei 4 nucleotidi: Adenina, Guanina, Citosina e Timina (dNTPs), da nucleotidi modificati denominati dideozinucleotidi (ddNTPs), questi sono uguali ai precedenti ma privi del gruppo ossidrilico (OH) del ribosio, che consente il propagarsi della catena nucleotidica nella direzione 5'→3', per cui quando viene inserito un dideozinucleotide funziona da terminatore della catena non avendo l'estremità 3'-OH libera (Fig.13).

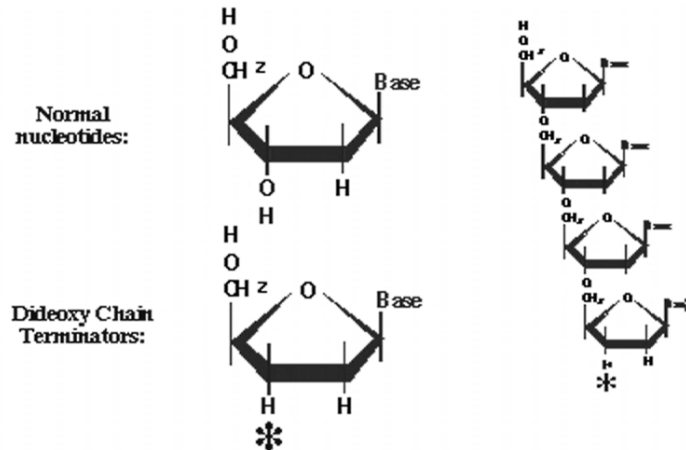


Figura 13 Struttura chimica di un nucleotide e dideozinucleotide alla base del “Cycle sequencing” e del principio della “terminazione della catena”.

I 4 dideozinucleotidi (ddNTPs) sono inoltre marcati con molecole fluorescenti (tecnologia BigDye Terminator®) questo permette di evidenziare ogni terminatore in base alla propria fluorescenza, e quindi marcare il frammento a cui è legato.

La proporzione, ad esempio, tra dATP e ddATP sarà tale che non tutte le volte che la DNA polimerasi incontra una adenina inserisce un ddATP che blocca la replicazione, ma può inserire una base normale dATP che permette l'allungamento della catena. I frammenti così marcati con molecole fluorescenti, vengono separati in elettroforesi capillare mediante il sequenziatore automatico. Il segnale di fluorescenza viene evidenziato eccitando la molecola con una fonte di energia (Laser). La fluorescenza riemessa viene captata attraverso rilevatori quali CCD camera o fotodiodi che trasformano tale segnale luminoso in segnale elettrico. Il computer registra il segnale e mediante opportuni software lo trasforma in elettroferogramma che è la ricostruzione lineare della sequenza nucleotidica (Fig.14).

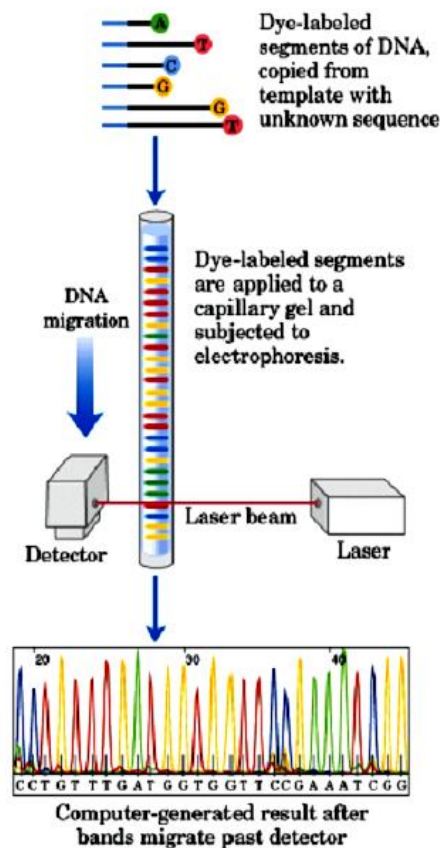


Figura 14 Elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico e relativo elettroferogramma finale (sequenza).

Dopo aver controllato i risultati dell'amplificazione delle colonie, gli amplificati risultati positivi sono stati purificati tramite prodotto SureClean (Bioline) e successivamente quantizzati con il Fluorimetro Qubit®-Invitrogen™.

Sono così stati processati una media di 7-8 cloni per individuo, passando prima dal Cycle sequencing, poi da un'ulteriore purificazione tramite precipitazione in etanolo/EDTA/sodio acetato per togliere l'eccesso di fluorescenza dovuto alla presenza dei ddNTPs (Big Dye Terminator) non incorporati, fino ad arrivare al sequenziamento vero e proprio con il caricamento dei campioni sul sequenziatore automatico.

Le sequenze così ottenute sono state analizzate tramite il software "sequencing Analysis software v5.2" (PE Applied Biosystems™) e poi allineate insieme anche alle sequenze alleliche degli individui che erano risultate omozigoti dai profili sscp, tramite il software "MEGA4 -molecular evolutionary

genetics analysis". Così facendo è stato possibile ottenere un quadro complessivo degli alleli totali che sono stati trovati.

2.4 Analisi statistica

Per la visualizzazione e la correzione dei cromatogrammi delle sequenze è stato utilizzato il programma FinchTV 1.4.0 (Geospiza, Inc., Usa). Le sequenze, allineate con il programma CLUSTAL X version 1.83 (Thompson et al., 1997), sono state traslate in sequenze aminoacidiche usando MEGA version 3.1 (Kumar et al., 2004).

La percentuale di sostituzioni non-sinonime (dN) rispetto alle sinonime (dS) è stata calcolata con il programma MEGA 3.1, usando il Nei-Gojobori method con la correzione Jukes-Cantor per le sostituzioni multiple (Nei & Gojobori, 1986) e con 1000 repliche di bootstrap. La localizzazione dei codoni putativi PBR è stata dedotta dalle sequenze MHC pubblicate e descritte nel lavoro di Westerdhal et al. (2000).

Per i codoni PBR è prevedibile un tasso di mutazione non-sinonime più alto delle sinonime rispetto alle altre zone del gene, essendo una regione sottoposta a forte selezione bilanciante. Al contrario, la selezione purificante viene generalmente trovata a governare la variazione delle sequenze al di fuori della PBR, probabilmente a causa di vincoli funzionali della proteina. Lo Z-test, come attuato in MEGA, è stato effettuato per verificare la selezione positiva che agisce sul frammento MHC.

La proporzione dN/dS è stata così calcolata considerando la regione PBR e la restante regione non-PBR.

Analisi filogenetica

E' stata svolta un'analisi filogenetica utilizzando il programma MODELTEST v. 3.04 (Posada & Crandall, 1998), per calcolare il modello evolutivo che meglio si adatta agli alleli trovati, basato sul criterio informativo di Akaike (AIC). Il modello evolutivo selezionato è JC + I (Jukes & Cantor, 1969).

È stata eseguita un'analisi Bayesiana (BI) utilizzando MrBayes ver. 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) utilizzando i parametri del modello suggerito da Modeltest 3.7, 2000000 generazioni ed alberi campionati ogni 100 generazioni. È stato costruito un albero di consenso (Strict Consensus) utilizzando MrBayes, dopo un burn-in di 1000.

Le sequenze rappresentative dell'esone 2 dei geni MHC classe II β di alcuni uccelli, sono state cercate su GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) in modo da dedurre la monofilia degli alleli del fagiano comune (Tab. 3). Una

sequenza del gene della classe IIB dell'uomo è stata usata come outgroup (Genbank Acc. No AB046526).

Taxon	Famiglie	Sequenze	Genbank Acc N°
<i>Homo sapiens</i>	Hominidae		AB046526
<i>Gallus gallus</i>	Phasianidae		AJ248579
<i>Phasianus colchicus</i>	Phasianidae		
		Phco-DABTUS 9	HQ738655
		Phco-DABTUS 10	HQ738656
		Phco-DABTUS 11	HQ738657
		Phco-DABTUS 12	HQ738658
		Phco-DABTUS 13	HQ738659
		Phco-DABTUS 14	HQ738660
		Phco-DABTUS 15	HQ738661
		Phco-DABTUS 16	HQ738662
		Phco-DABTUS 17	HQ738663
		Phco-DABTUS 18	HQ738664
		Phco-DABTUS 19	HQ738665
		Phco-DABTUS 1	EF211103
		Phco-DABTUS 2	EF211104
		Phco-DABTUS 3	EF211105
		Phco-DABTUS 4	EF211106
		Phco-DABTUS 5	EF211107
		Phco-DABTUS 6	EF211108
		Phco-DABTUS 7	EF211109
		Phco-DABTUS 8	EF450769
		DAB02	X75403
		DAB03	X75404
		DAB04	X75406
		DAB05	X75407
		DAB07	AJ224350
		DAB08	AJ224351
		DAB09	AJ224352
<i>Andropadus virens</i>	Pycnonotidae		AY437899
<i>Aphelocoma coerulescens</i>	Corvidae		ACU23973
<i>Petroica australis</i>	Petroicidae		AY730430
<i>Passer domesticus</i>	Passeridae		AY518173
<i>Melanospiza richardsoni</i>	Fringillidae		AY064426

Tabella 3 Sequenze incluse nell'analisi filogenetica.

Scelta femminile e diversità ai loci MHC

A causa dell'alta diversità genetica trovata nei maschi (24 differenti genotipi MHC su un totale di 37 maschi, numero medio di genotipi per individuo = 1.5) non è stato possibile analizzare l'associazione tra gli specifici profili MHC e i caratteri secondari sessuali maschili come fatto in uno studio precedente (Baratti et al., 2010). Tuttavia è stato possibile indagare se i caratteri morfologici maschili differiscono tra individui omo- ed eterozigoti ai loci MHC in un modello ANOVA a due vie che includeva il trattamento così come

l'interazione tra l'eterozigosi e il trattamento (Dimensione del campione: maschi omozigoti = 10, maschi eterozigoti = 27; femmine omozigoti = 27, femmine eterozigoti = 54).

E' stato anche testato se maschi e femmine preferivano partner eterozigoti piuttosto che partner omozigoti ai loci MHC (individui omozigoti portano un solo allele, mentre tutti gli altri individui sono classificati come eterozigoti).

Per quantificare le differenze ai loci MHC dei partner abbiamo usato 3 indici, considerando tutti i possibili accoppiamenti tra maschi e femmine (n=2997 accoppiamenti), per investigare i modelli di scelta sessuale basati sull'MHC. Le femmine potrebbero infatti preferire l'accoppiamento con maschi geneticamente simili, con maschi dissimili, o con maschi mediamente simili, sulla base della specifica combinazione degli MHC che massimizzi la fitness della prole.

Questi possibili modelli di scelta sessuale basata sull'MHC sono stati saggiati in questo studio mettendo in relazione ciascuno dei 3 indici di distanza dell' MHC tra i partner con il numero di copule, assumendo che il numero di copule delle femmine con un particolare maschio rifletta la solidità della scelta femminile (Bonisoli-Alquati et al., 2010). Abbiamo adottato i seguenti indici:

- 1) MHC-Similarity (M_{xy} , espressa come i valori della variante-condivisa calcolati in accordo a Wetton et al. (1987), per cui la proporzione delle varianti MHC condivise in una coppia è calcolata come il doppio del numero delle varianti condivise dai 2 partner, diviso la somma delle varianti di ogni individuo. Quindi, l'MHC-Similarity assume un valore di zero per quegli accoppiamenti che non condividono nessun allele (n=2077, 69.3%), uno per quelle coppie con profilo MHC identico (n=58, 1.9%), e valori intermedi per tutte quelle coppie che condividono almeno un allele (n=862, 28.8%);

similarità ai loci MHC

MHC-Similarity (M_{xy})

(Wetton et al. 1987)

$$M_{xy} = 2 F_{xy} / (F_x + F_y)$$

F_{xy} : n° di alleli condivisi tra x e y

F_x, F_y sequenze di x e di y

Valore 0: nessun allele condiviso (n=2077 - 69,3%)

Valore 1: MHC identico (n=58 - 1,9%)

Valori intermedi: almeno 1 allele in comune (n=862 - 28,8%)

- 2) L'insieme delle distanze genotipiche tra i due partner (MF-Distance), calcolata come la media di tutte le distanze tra coppie di aminoacidi di tutti gli alleli presenti nei due partner (modificata da Landry et al., 2001);

distanza aminoacidica MF-D

MF-Distance (XY)

(Landry et al., 2001)

Data dalla somma di tutte le distanze AA
degli alleli dei due partners coinvolti nella
copula

$$\mathbf{MF-D} = DA,B+DB,C+DA,C+\dots$$

- 3) L'insieme delle distanze genotipiche tra i due partner basata su siti putativi coinvolti nella PBR, protein binding region (MF-DistancePBR); la metodologia di calcolo è simile a quella utilizzata per ottenere l'Mf-distance, ma le distanze tra gli alleli erano basate soltanto sui siti PBR (Landry et al., 2001).

distanza aminoacidica MF-PBR

MF-DistancePBR

(alleli presenti solo nella PBR)

RISULTATI

La tipizzazione tramite CE-SSCP è avvenuta su un totale di 118 campioni di cui 81 femmine (40 trattate - 41 di controllo) e 37 maschi (17 trattati - 18 di controllo); 37 profili SSCP hanno dato come risultato individui omozigoti che sono stati direttamente sequenziati, mentre dei restanti 81 profili risultati eterozigoti, sono stati selezionati 46 individui rappresentativi dei vari raggruppamenti SSCP (in media 2-3 per ogni gruppo), che sono stati prima clonati e poi sequenziati.

I genotipi femminili presentano da 1 fino a 4 alleli:

2 alleli \rightarrow 30 individui ♀

4 alleli \rightarrow 4 indivizii ♀

1 allele \rightarrow 10 indivizii ♂

3 alleli \rightarrow 9 indivizii ♂

[illegible]

37

Nelle sequenze dei codoni PBR dN eccede le dS in maniera significativa ($Z=2.35$, $p=0.01$), ma non nella zona non-PBR ($Z=0.94$, $p=0.35$).

Analisi filogenetica

Osservando l'albero filogenetico (Fig.15) è possibile notare come tutti e 15 gli alleli trovati, di cui 4 già noti (Wittzell et al., 1994; von Schantz, 1996; Baratti et al., 2010) e 11 mai descritti, siano appartenenti allo stesso clade, comprendente gli alleli del fagiano e quelli del pollo (*Gallus gallus*). Gli alleli appartenenti ai due diversi loci paraloghi non possono essere riconosciuti su base filogenetica, come precedentemente dimostrato (Wittzell et al., 1999; Worley et al., 2008).

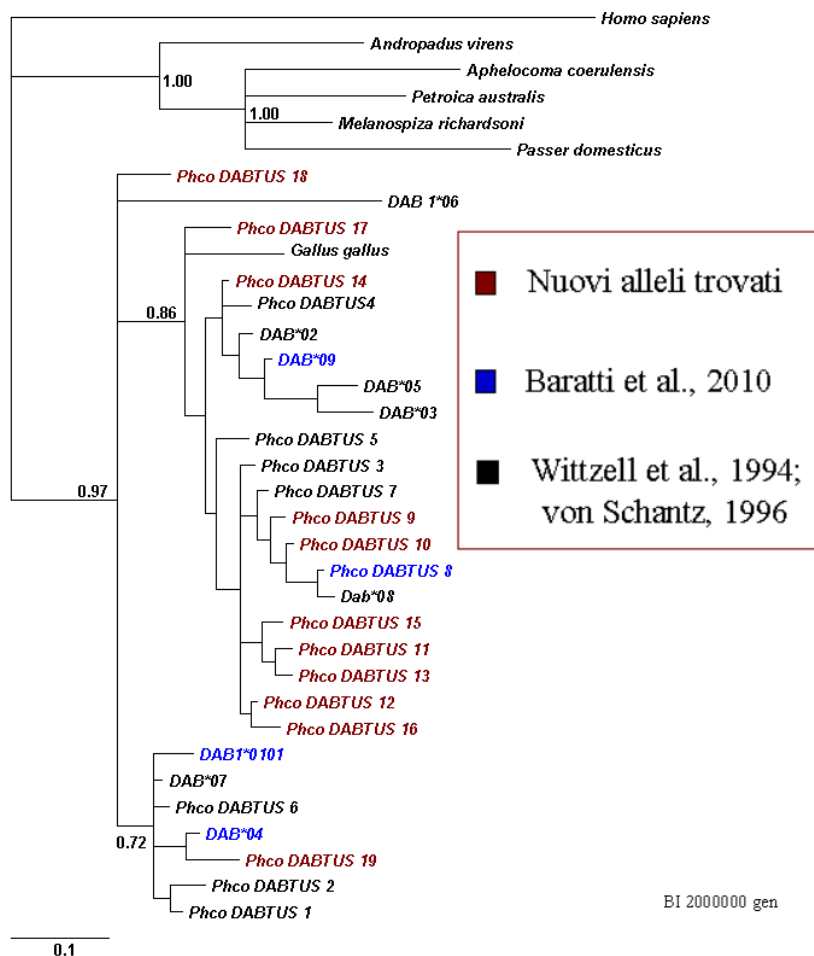


Figura 15 Albero di consenso (Strict Consensus) ottenuto utilizzando MrBayes 3.1, con ai nodi le probabilità a posteriori.

Relazione tra eterozigosi e caratteri morfologici maschili

I caratteri morfologici maschili sono stati messi in relazione con la diversità ai loci MHC. Non risultano correlazioni statisticamente significative tra caratteri morfologici maschili e l'eterozigosi ai loci MHC (tutti $p > 0.10$, vedi Tab. 5). Nei modelli ANOVA dei caratteri morfologici, l'interazione a due a due tra il trattamento maschile e l'eterozigosi non è significativa in nessun caso (tutti $p > 0.11$, dettagli non mostrati).

Caratteri maschili	Media (e.s.)	
	Omozigoti (n = 10)	Eterozigoti (n = 27)
Lunghezza del tarso (mm)	73.41 (1.28)	72.39 (0.63)
Massa corporea (g)	128.70 (4.55)	129.63 (2.65)
CMI (mm x 100)	35.90 (13.16)	32.07 (12.70)
Pennette auricolari (mm)	20.60 (0.60)	21.00 (0.41)
Lunghezza sperone (mm)	20.91 (0.33)	21.21 (0.42)
Area caruncola (cm ²)	6.96 (0.30)	6.90 (0.13)
Tonalità caruncola (visible)	0.36 (0.01)	0.35 (0.01)
Saturazione caruncola (visible)	0.53 (0.01)	0.54 (0.01)
Brillantezza caruncola (visible)	0.14 (0.01)	0.14 (0.01)
Tonalità caruncola (UV)	-0.46 (0.03)	-0.45 (0.02)
Saturazione caruncola (UV)	0.08 (0.01)	0.08 (0.01)
Brillantezza caruncola (UV)	0.10 (0.01)	0.09 (0.01)
Rango	6.90 (1.16)	7.70 (0.84)

Tabella 5 Statistica descrittiva dei caratteri sessuali secondari ed ordinari in relazione all'eterozigosi ai loci MHC

Scelta sessuale femminile in relazione alla diversità ai loci MHC

La scelta sessuale femminile non risulta associata alle misure di distanza aminoacidica MF-D e MF-PBR e non esiste, inoltre, nessuna preferenza per partner omo- od eterozigoti (Tab. 6).

Andando a valutare invece la misura di distanza calcolata sul numero di alleli condivisi (MHC-Similarity), osserviamo valori significativi (Tab. 6): l'indice calcolato con un'analisi a due livelli (compagno simile o dissimile), ci dice che le femmine scelgono il proprio compagno sulla base della condivisione di alleli. Un livello di significatività maggiore è stato ottenuto con un'analisi a tre livelli (nessun allele condiviso, almeno 1 allele condiviso, stessi alleli) in cui le femmine sembrano scegliere maschi con un livello intermedio di diversità ai loci MHC (Tab. 6).

Poichè la stima dei maschi e delle femmine con identici alleli era basata su soltanto quattro copule rispetto ai 58 accoppiamenti totali, è stato ritenuto che ciò potesse confondere i risultati. Sono state quindi ripetute tutte le analisi sull'MHC-Similarity rimuovendo gli abbinamenti tra MHC identici; i risultati sono stati ancor più significativi così da confermare l'esclusione di questi dati (Tab. 6, colonna di destra).

	Includendo tutti i dati (n = 2997 coppie)				Escludendo coppie di partner con profilo MHC identico (n = 2939 coppie)			
	Stima (e.s.)	z	p	AIC	Stima (e.s.)	z	p	AIC
<i>MHC similarity</i>								
Termine lineare	0.415 (0.198)	2.10	0.036	1852	0.620 (0.218)	2.84	0.005	1830
Termine quadratico	-0.919 (0.809)	-1.14	0.26	1852	0.840 (1.150)	0.73	0.47	1831
<i>MHC similarity (factor)</i>								
Differente	-2.64 (0.27)	7.65	0.021	1850	-2.63 (0.27)	2.47	0.013	1831
Simile	-2.34 (0.27)				-2.34 (0.27)			
Identico	-3.09 (0.57)							
<i>MFdistance</i>								
Termine lineare	-1.51 (1.06)	-1.43	0.15	1854				
Termine quadratico	-19.17 (14.93)	-1.28	0.20	1854				
<i>MFdistancePBR</i>								
Termine lineare	-0.548 (0.531)	-1.03	0.30	1855				
Termine quadratico	1.440 (3.069)	0.47	0.64	1857				
<i>Eterozigosi maschile</i>								
Eterozigosi maschile	-0.420 (0.319)	-1.32	0.18	1854				
<i>MHC diversity maschile</i>								
MHC diversity maschile	-0.019 (0.200)	-0.09	0.92	1856				

Tabella 6 Effetto delle differenze nei profili MHC dei partner sul numero delle copule. Tutti i modelli includono il trattamento con testosterone del maschio, della femmina e la loro interazione come effetti fissi.

Le interazioni tra le misure di distanza MHC, l'eterozigosi maschile, la diversità ai loci MHC maschile ed il trattamento delle uova di maschi e femmine non sono risultate statisticamente significative quando i modelli sono stati eseguiti su l'intero dataset ($p > 0.10$).

Escludendo i 4 eventi di accoppiamento relativi agli individui con MHC identici, è stata trovata una interazione marginalmente significativa tra trattamento maschile e MHC-Similarity dei partner ($z = -1.95$; $p = 0.051$; $AIC = 1830$). Risultati simili sono stati ottenuti considerando l'indice MHC-Similarity come una variabile continua ($z = 1.90$; $p = 0.058$; $AIC = 1828$). Queste interazioni suggeriscono la possibilità che maschi trattati con testosterone possano ottenere più copule rispetto ai maschi di controllo, indipendentemente dal numero di alleli condivisi con la femmina.

Questo dato risulta più forte nelle interazioni comportamentali tra femmine e maschi che condividono tutti (MHC-Similarity = 1) o nessun allele (MHC-Similarity = 0), mentre nel caso di maschi che condividono con le femmine un numero intermedio di alleli, il trattamento con testosterone sembra non influire sulla scelta femminile convalidando così l'ipotesi per la quale le femmine tendono a copulare di più con maschi con livelli intermedi di MHC-Similarity (Fig. 16).

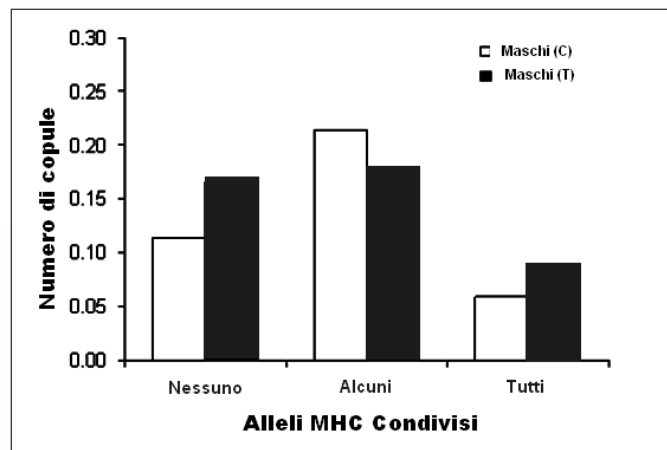


Figura 16 Media del numero di copule in relazione sia agli alleli condivisi tra partner (nessuno: maschi e femmine non condividevano nessun allele; tutti: maschi e femmine avevano lo stesso genotipo; alcuni: maschi e femmine condividevano almeno un allele) sia al trattamento maschile.

DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI

In questo studio sono stati misurati i caratteri sessuali maschili ordinari e secondari a maturità sessuale, gli incontri agonistici maschi-maschio, il numero di accoppiamenti e la loro correlazione con il profilo MHC dopo trattamento con testosterone *in ovo* dei maschi e delle femmine.

È stato trovato che l'aumento sperimentale di testosterone *in ovo* diminuisce la frequenza di accoppiamento delle femmine, mentre i maschi trattati ottengono più copule, specialmente con femmine di controllo, indipendentemente dal loro rango nella gerarchia di dominanza sociale e dall'espressione dei vari caratteri sessuali secondari. L'alto successo nel numero degli accoppiamenti dei maschi trattati può essere spiegato dalle differenze nella maturazione sessuale indotte dall'iniezione di testosterone. In uno studio preliminare è stato trovato che questo tipo di manipolazione non promuove l'aumento di massa corporea e non influenza l'espressione di caratteri sessuali secondari (Bonisoli-Alquati et al., 2010): al contrario, i maschi di controllo presentavano caruncole più rosse rispetto ai maschi trattati, dovute probabilmente a una mobilitazione dei carotenoidi, normalmente utilizzati nella colorazione della caruncola, per far fronte all'effetto immunosoppressore del testosterone (Alonso-Alvarez et al., 2007).

L'osservazione che la massa corporea del maschio o i caratteri sessuali secondari non influenzano l'attrattiva del maschio (Bonisoli-Alquati et al., 2010) sembra essere in disaccordo con i risultati precedenti (Mateos & Carranza, 1995, 1997). Tuttavia è stato dimostrato che in fagiani maschi di circa un anno di vita (come nello studio di Bonisoli e coll. ed anche nel presente lavoro), le femmine non scelgono sulla base di un determinato ornamento (sperone) che invece viene scelto quando posseduto da maschi di due o più anni (Grahn & von Schantz, 1994; von Schantz et al., 1997). Dato che nel fagiano l'espressione di alcuni caratteri sessuali secondari aumenta con l'età (Goransson et al., 1990), è possibile che per i giovani maschi l'espressione di caratteri sessuali poco esagerati costituisca un costo minore e pertanto non vengano considerati dalle femmine come un segnale onesto di qualità. Inoltre studi precedenti sulla selezione sessuale nel fagiano hanno suggerito che le decisioni di scelta femminile potrebbero essere basate su ornamenti multipli (Mateos & Carranza, 1995, 1997; Matteos, 1998; Papeschi & Dessì-Fulgheri, 2003). L'uso di informazioni multiple potrebbe essere adattativo in quanto differenti segnali potrebbero fornire informazioni sui differenti aspetti della qualità del maschio permettendone una valutazione più accurata (Moller & Pomiankowski, 1993). I risultati ottenuti suggeriscono che le femmine potrebbero valutare l'intensità di

ogni segnale in relazione agli altri, piuttosto che l'espressione assoluta dei diversi caratteri.

Non è stata trovata nessuna relazione tra rango e scelta femminile. La scelta femminile si baserebbe piuttosto sui display comportamentali, la cui onestà potrebbe essere rafforzata dalle interazioni sociali con gli altri maschi. Per lo stesso motivo i caratteri sessuali maschili non hanno nessun effetto sugli esiti degli incontri agonistici, così come nella determinazione del rango (Bonisoli-Alquati et al., 2010). Ciò potrebbe dipendere dalla difficoltà riscontrata dal maschio dominante nel prevenire le copule furtive dei maschi subordinati. Infatti, anche se nell'esperimento la sex ratio era compatibile con le dimensioni dell'harem naturale, la densità di individui presenti contemporaneamente nella voliera era di gran lunga superiore a quella naturale. Questo potrebbe aver alterato le interazioni all'interno della voliera stessa. Non essendo il rango correlato con la dimensione degli ornamenti, la scelta femminile non dovrebbe risentire dalla struttura sociale maschile presente nella voliera ma potrebbe essere diretta soltanto verso l'ornamento.

Nel presente lavoro, il basso numero di individui maschi e l'alto polimorfismo ai loci MHC trovato (24 differenti genotipi MHC in 37 maschi) non hanno permesso di svolgere analisi basate sul confronto tra specifici genotipi MHC e dimensioni dei caratteri fenotipici misurati e/o rango, come effettuato in studi precedenti (sperone, von Schantz, 1996, 1997, e caruncola, Baratti et al., 2010). In questi studi per il primo carattere è stato trovato che la lunghezza dello sperone è significativamente correlata con la diversità ai loci MHC. Analogamente è stato trovato che alcuni specifici profili MHC sono significativamente associati con la dimensione della caruncola (Baratti et al., 2010).

In questo studio, le correlazioni statistiche sia con le dimensioni dei caratteri sia con il rango in relazione ai profili MHC è stata svolta soltanto prendendo in considerazione l'omozigosi e l'eterozigosi (vedi Tabella 5). A questo proposito, non è stata trovata nessuna correlazione tra rango e dimensioni dei caratteri e diversità ai loci MHC.

L'aspetto più saliente della mia ricerca ha riguardato la relazione tra profili MHC dei partner e scelta sessuale femminile. È importante sottolineare l'interesse della ricerca data la scarsità di studi sulle relazioni tra preferenza femminile per ornamenti "esagerati" e profili MHC.

Nel mio studio proprio la scelta femminile per maschi dotati di certi profili MHC e di maggiori dimensioni degli ornamenti è stata valutata in maniera diretta, sulla base di osservazioni sperimentali del numero di copule avvenute tra partner. E' necessario comunque sottolineare che nelle analisi sperimentali, data l'alta densità, tutti i maschi si sono accoppiati almeno una volta, e quindi la valutazione della scelta femminile si è dovuta basare sul numero delle copule.

È emersa una preferenza femminile per maschi con un livello intermedio di diversità ai loci MHC. Questo risultato è in accordo con precedenti studi

condotti sullo spinarello (Reusch et al., 2001; Milinsky et al., 2005; Eizaguirre et al., 2009), sul tacchino (Bucholtz et al., 2004) e sul passero (Woelfing et al., 2009) in cui le femmine hanno preferito accoppiarsi con maschi dotati di un livello ottimale di diversità ai loci MHC, piuttosto che scegliere maschi simili o altamente diversi geneticamente (Huchard et al., 2010). Da un punto di vista adattativo, la scelta per livelli intermedi di variabilità potrebbe essere il risultato di un trade-off. La scelta di compagni con genotipi MHC molto simili porterebbe infatti ad un maggior rischio di inbreeding così come ad una perdita dell'eterozigosi, che promuove la resistenza ad una maggiore gamma di agenti patogeni. D'altro canto, l'accoppiamento con individui geneticamente troppo dissimili potrebbe portare alla perdita di adattamenti locali, importanti per la sopravvivenza dell'individuo in relazione a quel particolare ambiente o a particolari patogeni.

Questo tipo di preferenza femminile trova una ulteriore spiegazione nei meccanismi intrinseci a livello del sistema immunitario stesso. Ogni volta infatti che una molecola MHC viene aggiunta al repertorio di un individuo, i cloni delle cellule linfocitarie T che possono riconoscere quella molecola devono essere rimossi, così da evitare l'insorgenza di una risposta autoimmune. Quindi, il numero di alleli MHC presenti in una specie deriverebbero da un compromesso tra la selezione positiva per il riconoscimento di un più ampio repertorio antigenico (che favorirebbe un numero di alleli massimo) e una selezione negativa per i diversi recettori delle cellule linfocitarie T (che favorirebbe invece un numero più basso di alleli) (Janeway et al., 1999; Penn & Potts, 1999).

La diversità ai loci MHC potrebbe anche essere mantenuta attraverso la selezione frequenza-dipendente (Apanius et al. 1997; Hedrick & Kim 1999; Spurgin & Richardson 2010). Sotto questa selezione, un allele particolare è utile quando raro, ma svantaggioso quando comune, perché nella selezione verranno favoriti quei parassiti che potranno eludere i più comuni genotipi MHC degli ospiti, sfavorendo così quegli individui in possesso di alleli più comuni. Gli alleli rari saranno quindi favoriti fino a quando non aumenteranno a loro volta in frequenza e i parassiti evolveranno per sfuggire loro in una corsa alle armi co-evolutiva.

Secondo questo modello, l'evoluzione di preferenze direzionali per genotipi MHC localmente adattati potrebbe favorire così una scelta per livelli intermedi di condivisione allelica (Forsberg et al., 2007).

In questo studio ho così dimostrato che le femmine scelgono maschi dotati di certi profili MHC sulla base del modello "Optimal Dissimilarity" (Forsberg et al., 2007), nonostante questa scelta non sia indirizzata verso maschi con ornamenti più grandi o di rango superiore. Gli studi che hanno messo in evidenza la scelta femminile sia per determinati profili MHC e allo stesso tempo, per determinati caratteri sessuali, sono però molto scarsi. Nel pavone (Hale et al., 2009) la scelta femminile per maschi dotati di code più lunghe mediata da specifici profili MHC non è stata dimostrata, nonostante sia stata

trovata una correlazione significativa tra dimensioni degli ornamenti e profili MHC. Inoltre è stata messa in evidenza una scelta femminile per determinati profili MHC: Hale e coll. hanno osservato che le femmine di pavone ottenevano un maggiore successo riproduttivo (maggior numero di uova deposte per covata) accoppiandosi con maschi di alta qualità genetica in termini di MHC, ma senza che vi fosse una correlazione con l'espressione di caratteri sessuali secondari riferibili alla coda. L'unico lavoro in cui è stata dimostrata una scelta femminile per maschi dotati di un particolare carattere sessuale (sperone più lungo) mediato da un determinato profilo MHC, è quello di von Schantz et al. (1997) sul fagiano. In questo caso la scelta femminile è stata valutata però in maniera indiretta, contando quante volte le femmine venivano viste in un raggio di circa 100 metri da un maschio, senza però un'osservazione di veri e propri accoppiamenti.

Il fatto che sia così difficile trovare un supporto genetico alla scelta dell'ornamento probabilmente è da ricercare nel fatto che la scelta femminile potrebbe essere indirizzata ad ornamenti multipli (Petrie et al., 1991; Petrie, 1994; Papeschi & Dessi-Fulgheri, 2003). E' ipotizzabile infatti che le femmine scelgano il compagno prendendo in considerazione non uno soltanto, ma un pool di caratteri morfologici, andando a valutare più informazioni correlate tra di loro. Un'altra possibilità potrebbe essere che, essendo spesso gli ornamenti condizione-dipendenti, ed essendo la condizione fortemente influenzata dall'ambiente, le preferenze femminili potrebbero essere rivolte a differenti ornamenti in differenti condizioni ambientali (Bro-Jorgensen, 2010).

Inoltre, è probabile che la complessità analitica dei loci oggetti di studio e quindi l'intera base genetica sia talmente complessa da richiedere analisi più avanzate quali potrebbero essere quelle relative all'espressione genica e alle analisi di microarray, in modo da poter avere un quadro maggiore della variabilità genetica (tutti i geni MHC e non più soltanto uno, oltre che ai geni coinvolti nell'espressione dei caratteri sessuali).

BIBLIOGRAFIA

- Aeschlimann P.B., Haberli M.A., Reusch T.B., Boehm T., Milinski M., 2003. Female sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* use self-reference to optimize MHC allele number during mate selection. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 54:119-126.
- Alonso-Alvarez C., Bertrand S., Faivre B., Chastel O., Sorci G., 2007. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London, serie B*, 274: 819–825.
- Andersen P. S., Jespersgaard C., Vuust J., Christiansen M. and Larsen L. A., 2003. Capillary electrophoresis-based single strand DNA conformation analysis in high-throughput mutation screening. *Human Mutation*, 21:455–465.
- Andersson M., 1982. Female choice selects for extreme tail length in a widowbird. *Nature*, 299:818-820.
- Andersson M., 1994. *Sexual selection*: Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Andersson M., 1987. Genetic model of sexual selection: some aims, assumption and tests. In: Brandbury J.W., Andersson M. (Eds), *Sexual Selection: Testing the alternatives*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Andersson M., Simmons L.W., 2006. Sexual selection and mate choice. *Trends in Ecology and Evolution*, 21: 296-302.
- Apanius V., Penn D., Slev P.R., Ruff L.R., Potts W.K., 1997. The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology*, 17:179-224.
- Atha D.H., Wenz H.M., Morehead H., Tian J., O'Connell C., 1998. Detection of p53 Point Mutations by Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP): Analysis by Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis*, 19: 172–179.
- Balamurugan A., Sharma S.K., Mehra N.K., 2004. Human Leukocyte Antigen Class I Supertypes Influence Susceptibility and Severity of Tuberculosis. *Journal of Infection Disease*, 189: 805–811.
- Baratti M., Ammannati M., Magnelli C., Massolo A., Dessì-Fulgheri F., 2010. Are large wattles related to particular MHC genotypes in the male pheasant? *Genetica*, 138(6):657-65.
- Bateson P., 1983. Uncritical periods and insensitive sociobiology. *Behavioral and Brain Sciences*, 6: 102-103.
- Bernatchez L., Landry C., 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 363-377.
- Bingulac-Popovic J., Figueroa F., Sato A., Talbot W.S., Johnson S.L., Gates M., Postlethwait J.H., Klein J., 1997. Mapping of Mhc class I and class II

- regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics*, 46(2): 129-134.
- Birkhead T.R., Pizzari T., 2002. Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics*, 3:262-273.
- Bonisoli-Alquati A., Matteo A., Ambrosini R., Rubolini D., Romano M., Caprioli M., Dessì-Fulgheri F., Baratti M., Saino N., 2010. Effects of egg testosterone on female mate choice and male sexual behavior in the pheasant, *Hormones and Behaviour*. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.10.013.
- Bonneaud C., Mazuc J., Chastel O., Westerdahl H., Sorci G., 2004. Terminal investment induced by immune challenge and fitness traits associated with major histocompatibility complex in the house sparrow. *Evolution*, 58:2823-2830.
- Bro-Jørgensen J., 2010. Dynamics of multiple signalling systems: animal communication in a world in flux. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 292-300.
- Buchholz R., 2004. Effects of parasitic infection on mate sampling by female wild turkeys (*Meleagris gallopavo*): Should infected females be more or less choosy? *Behavioral Ecology*, 15(4): 687-694.
- Briganti F., Papeschi A., Mugnai T., Dessì-Fulgheri F., 1999. Effects of testosterone on male traits and behaviour in juvenile pheasants. *Ethology, Ecology and Evolution*, 11:171-178.
- Clarke B.C., Kirby D.R.S., 1966. Maintenance of histocompatibility polymorphism. *Nature*, 211: 999-1000.
- Cramp S., 1998. *The Birds of Western Palearctic vol V.*, Oxford University Press, Oxford.
- Danchin E.G., Pontarotti P., 2004 Towards the reconstruction of the bilaterian ancestral pre-MHC region. *Trends in Genetics*, 20(12): 587-591.
- Darwin C., 1871. *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex.* London: Murray.
- David H.A., 1987. Ranking from unbalanced paired-comparison data. *Biometrika*, 74: 432-436.
- Delacour J., 1977. *Pheasants of the world.* 2nd Ed. World Association and Saiga. Surrey.
- Del Guercio M.F., Sidney J., Hermanson G., Perez C., Grey H.M., Kubo R.T., Sette A., 1995. Binding of a peptide antigen to multiple HLA alleles allows definition of an A2-like supertype. *Journal of Immunology*, 154: 685-693.
- Del Hoyo J., Elliot A., Sargatal J., 1994. *Handbook of the birds of the world.* Vol 2 New World Vultures to Guinea Fowl. Lynx Edicions, Barcelona.
- Ditchkoff S.S., Lochmiller R.L., Masters R.E., Hoofer S.R., Van Den Bussche R.A., 2001. Major-histocompatibility-complex-associated variation in secondary sexual traits of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): evidence for good-genes advertisement. *Evolution*, 55:616-625.

- Doherty P.C., Zinkernagel R.M., 1975. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature*, 256: 50-52.
- Doytchinova I.A., Flower D.R., 2005. In Silico Identification of Supertypes for Class II MHCs. *Journal of Immunology*, 174: 7085-7095.
- Edwards S.V., Hedrick P.W., 1998. Evolution and ecology of MHC molecules from genomics to sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 13 (18): 305-311.
- Eizaguirre C., Yeates S.E., Lenz T.L., Kalbe M., Milinski M., 2009. MHC-based mate choice combines good genes and maintenance of MHC polymorphism. *Molecular Ecology*, 18: 3316-3329.
- Endler J. A., 1990. On the measurement and classification of color in studies of animal color patterns. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41: 315-352.
- Faivre B., Préault M., Salvadori F., Théry M., Gaillard M., Cézilly F., 2003. Bill colour and immunocompetence in the European blackbird. *Animal Behaviour*, 65: 1125-1131.
- Fisher R.A., 1930. *The genetic theory of natural selection* Clarendon Press.Oxford.
- Folstad L., Karter A.J., 1992. Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. *The American Naturalist*, 139: 603-622.
- Forsberg L., Dannewitz J., Petersson E., Grahn M., 2007. Influence of genetic dissimilarity in the reproductive success and mate choice of brown trout – females fishing for optimal MHC dissimilarity. *Journal of Evolutionary Biology*, 20:1859–1869.
- Froman D.P., Pizzari T., Feltmann A.J., Castillo-Juarez H., and Birkhead T.R., 2002. Sperm mobility: Mechanisms of fertilizing efficiency, genetic variation and phenotypic relationship with male status in the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 269: 607–612.
- Garrigan D., Hedrick P.W., 2003. Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. *Evolution* 57(8): 1707-1722.
- Goransson G., von Schantz T., Froberg I., Helgee A., Wittzell H., 1990. Male characteristics, viability, and harem size in the pheasant (*Phasianus colchicus*). *Animal Behaviour*, 40: 89-104.
- Grahn M., von Schantz T., 1994. Fashion and age in pheasants: age differences in mate choice. *Proceedings of the Royal Society of London, Serie B*, 255: 237-241.
- Groothuis P.A., 2005. Benefit Transfer: A Comparison of Approaches. *Growth and Change*, 36:551–564.
- Hale M. L., Verduijn M. H., Moller A. P., Wolff K., Petrie M., 2009. Is the peacock's train an honest signal of genetic quality at the major histocompatibility complex?. *Journal of Evolutionary Biology*, 22: 1284–1294.

- Hamilton W.D., Zuk M., 1982. Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science*, 218: 229-232.
- Hedrick P.W., Kim T. J., 1999. Genetics of complex polymorphisms: parasites and maintenance of MHC variation, pp. 204–234 in *Genetics, Evolution, and Society*, edited by R. Singh and C. Krimbas. Harvard University Press, Cambridge, MA
- Hill D., Robertson P., 1988. Breeding Success of Wild and Hand-Reared Ring-Necked Pheasants. *The Journal of Wildlife Management*, 52 (3): 446-450.
- Huchard E., Knapp L.A., Wang J., Raymond M., Cowlshaw G., 2010. MHC, mate choice and heterozygote advantage in a wild social primate. *Molecular Ecology*, 19: 2545–2561.
- Inazuka M., Wenz H.M., Sakabe M., Tahira T., Hayashi K., 1997. A streamlined mutation detection system: multi-color post-PCR fluorescence-labeling and SSCP analysis by capillary electrophoresis. *Genome Research*, 7 pp: 1094–1103.
- Jäger I., Eizaguirre C., Griffiths S.W., Kalbe M., Krobach C.K., Reusch T.B., Schaschl H., Milinski M., 2007. Individual MHC class I and MHC class IIB diversities are associated with male and female reproductive traits in the three-spined stickleback. *Journal of Evolutionary Biology*, 20(5), 2005-2015.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Capra J.D., 1999. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Publishing, New York.
- Johnsgard P.A., 1999. *The pheasants of the World. Biology and Natural History*. 2nd Ed. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Jordan W.C., Bruford M.W. 1998. New perspectives on mate choice and the MHC. *Heredity*, 81:239-245.
- Jukes T. H., Cantor C. R., 1969. Evolution of protein molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism* (ed. Munro HM), pp. 21-132. New York Academic Press, New York.
- Kasahara, M., Suzuki T. and Du Pasquier L., 2004. On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Trends in Immunology* 25, 105-111.
- Kaufman D.B., Platt J.L., Rabe F.L., Dunn D.L., Bach F.H., Sutherland D.E., 1990. Differential roles of Mac-1+ cells, and CD4+ and CD8+ T lymphocytes in primary nonfunction and classic rejection of islet allografts. *Journal of Experimental Medicine*, 172: 291-302.
- Kelley J., Walter L., Trowsdale J., 2005. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics*, 56: 683-695.
- Klein J., 1986. *Natural history of the major histocompatibility complex*. New York: John Wiley & Sons.
- Klein J., 1987. Origin of major histocompatibility complex polymorphism: the trans-species hypothesis. *Human Immunology*, 19: 155-162.

- Kourkine I.V., Hestekin C.N., Barron A.E., 2002. Technical challenges in applying capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism for routine genetic analysis. *Electrophoresis*, 23: 1375-1385.
- Kroemer G., Guillemot F., Auffray C., 1990. Genetic organization of the chicken MHC. *Immunological Research*, 9(1): 8-19.
- Kumar S., Tamura K., Masatoshi N., 2004. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2): 150-163.
- Landry C., Bernatchez L., 2001. Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology*, 10: 2525-2539.
- MacDonald K.S., Fowke K.R., Kimani J., Dunand V.A., Nagelkerke N.J.D., Blake Ball T., Oyugi J., Njagi E., Gaur L.K., Brunham R.C., Wade J., Luscher M.A., Krausa P., Rowland-Jones S., Ngugi E., Bwayo J.J., Plummer F.A., 2000. Influence of HLA Supertypes on Susceptibility and Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Journal of infectious diseases*, 181: 1581-1589.
- Mays J.H.L., Hill G.E., 2004. Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 554-559.
- Mateos C., 1998. Sexual selection in the ring-necked pheasant: a review. *Ethology Ecology and Evolution*, 10: 313-332.
- Mateos C., Carranza J., 1995. Female choice for morphological features of male ring-necked pheasants. *Animal Behaviour*, 49: 737-748.
- Mateos C., Carranza J., 1997. Signals in intra-sexual competition between ring-necked pheasant males. *Animal Behaviour*, 53: 471-485.
- Milinski M., 2003. The function of mate choice in sticklebacks: optimizing Mhc genetics. *Journal of Fish Biology*, 63:1-16.
- Milinski M., 2006. The Major Histocompatibility Complex, Sexual Selection, and Mate Choice. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37: 159-186.
- Milinski M., Griffith S., Wegner K.M., Reusch T.B.H., Haas-Assenbaum A., Boehm T., 2005. Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102: 4414-4418.
- Miller M.M., Goto R., Bernot A., Zoorob R., Auffray C., Bumstead N., Briles W.E., 1994. Two Mhc class I and two Mhc class II genes map to the chicken Rfp-Y system outside the B complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 4397-4401.
- Møller A.P., Pomiankowski A., 1993. Why have birds got multiple sexual ornaments? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 32: 167-176.
- Mousseau T.A., Fox C.W., 1998. Maternal effects as adaptations. Oxford Univ Press. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 403.

- Neff B.D., Pitcher T.E., 2005. Genetic quality and sexual selection: an integrated framework for good genes and compatible genes. *Molecular Ecology*, 14: 19-38.
- Nei M., Gojobori T., 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 3: 418-426.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T., 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 2766-70.
- Papeschi A., Dessi-Fulgheri F., 2003. Multiple ornaments are positively related to male survival in the common pheasant *Animal Behavior*, 65: 143-147.
- Papeschi A., Briganti F., Dessi-Fulgheri F., 2000. Winter androgen levels and wattle size in male Common Pheasants. *Condor*, 102: 193-197.
- Penn D.J., Potts W.K., 1999. The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. *The American Naturalist*, 153(2): 145-164.
- Penn D.J., 2002. The scent of compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology*, 108: 1-21.
- Petrie M., 1994. Improved growth and survival of offspring of peacocks with more elaborate trains. *Nature*, 371: 598-599.
- Petrie M., Halliday T., Sanders C., 1991. Peahens prefer peacocks with more elaborate trains. *Animal Behavior*, 41: 323-331.
- Piertney S.B., Oliver M.K., 2006. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Journal Of Heredity*, 96: 7-21.
- Posada D., Crandall K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817- 818.
- Potts W.K., Wakeland E.K., 1990. Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. *Trends in Ecology and Evolution*, 5: 181-186.
- Reusch T.B., Haberli M.A., Aeschlimann P.B., Milinski M., 2001. Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. *Nature*, 414: 300-302.
- Ridley M.W., Hill D.A., 1987. Social organization in the pheasant (*Phasianus colchicus*): harem formation, mate selection and the role of mate guarding. *Journal of Zoology*, 211: 619-630.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- Rubolini D., Pupin F., Sacchi R., Gentili A., Zuffi M.A., Galeotti P., Saino N., 2006. Sexual dimorphism in digit length ratios in two lizard species. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular and Evolutionary Biology*, 288: 491-497.

- Sambrook J.G., Russell R., Umrana Y., Edwards Y.J., Campbell R.D., Elgar G., Clark M.S., 2002. Fugu orthologues of human major histocompatibility complex genes: a genome survey. *Immunogenetics*, 54: 367-380.
- Schwensow N., Fietz J., Dausmann K., Sommer S., 2007a. MHC-associated mating strategies and the importance of overall genetic diversity in an obligate pair-living primate. *Evolutionary Ecology*, 22: 617-636.
- Schwensow N., Fietz J., Dausmann K., Sommer S., 2007b. Neutral versus adaptive genetic variation in parasite resistance: importance of MHC-supertypes in a free-ranging primate. *Heredity*:1-13.
- Scialpi A., Mengoni A., 2008. La PCR e le sue varianti. Quaderno di laboratorio, Firenze University Press.
- Sette A., Sidney J., 1998. HLA supertypes and supermotifs: a functional perspective on HLA polymorphism. *Current Opinion in Immunology*, 10: 478-482.
- Sette A., Livingstone B., McKinney D., Appella E., Fikes J., Sidney J., Newman M., Chesnut R., 2001. The development of multi-epitope vaccines: epitope identification, vaccine design and clinical evaluation. *Biologicals*, 29: 271-276.
- Spurgin L.G., Richardson D.S., 2010. How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings, *Proceedings of the Royal Society of London, serie B*, 277: 979-988.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., (1997). The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Tregenza T., Wedell N., 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Molecular Ecology*, 9: 1013-1027.
- Trowsdale J., 1995. "Both bird and man and beast": comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics* 41:1-17.
- Vaurie C., 1965. The birds of Palaearctic fauna: non-Passeriformes. Witherby Ltd. London.
- von Schantz T., Goransson G., Grahn M., 1994. Intersexual selection and reproductive success in the pheasant *Phasianus colchicus*. *The American Naturalist*, 144(3): 510-527.
- von Schantz T., Wittzell H., Goransson G., Grahn M., 1997. Mate choice, male condition-dependent ornamentation and MHC in the pheasant. *Heredity*, 127(1-2): 133-140.
- von Schantz T., Wittzell H., Goransson G., Grahn M., Persson K., 1996. MHC genotype and male ornamentation: genetic evidence for the Hamilton-Zuk model. *Proceedings of the Royal Society of London, serie B*, 263(1368): 265-271.
- Wegner K.M., Kalbe M., Kurtz J., Reusch T.B.H., Milinski M., 2003a. Parasite selection for immunogenetic optimality. *Science* 301: 1343-1343.

- Wegner K.M., Reusch T.B.H., Kalbe M., 2003b. Multiple parasites are driving major histocompatibility complex polymorphism in the wild. *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 224-232.
- Wenz H.M., Robertson J.M., Menchen S., Oaks F., Demorest D.M., Don Scheibler, Rosenblum B.B, Wike C., Gilbert D.A. and Efcavitch J.W., 1998. High-Precision Genotyping by Denaturing Capillary Electrophoresis. *Genome Research*, 8: 69-80.
- Westerdahl H., Wittzell H., Von Schantz T., 2000. MHC diversity in two passerine birds: no evidence for a minimal essential MHC. *Immunogenetics*, 52: 92 – 100.
- Wetton J.H., Carter R.E., Parkin D.T., and Walters D., 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 327: 147–149.
- Wittzell H., von Schantz T., Zoorob R. and Auffray C., 1994. Molecular characterization of three MHC class II B haplotypes in the ring-necked pheasant. *Immunogenetics*, 39: 395-403.
- Wittzell H., Bernot A., Auffray C. and Zoorob R., 1999. Concerted evolution of two Mhc class II B loci in pheasants and domestic chickens. *Molecular Biology and Evolution*, 16(4): 479-490.
- Woelfing B., Traulsen A., Milinski M., Boehm T., 2009. Does intra-individual major histocompatibility complex diversity keep a golden mean?. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B. Biological Science*, 364: 117–128.
- Worley K., Gillingham M., Jensen P., Kennedy L.J., Pizzari T., Kaufman J., Richardson D.S., 2008. Single locus typing of MHC class I and class II B loci in a population of red jungle fowl. *Immunogenetics*, 60: 233-247.
- Zelano B., Edwards S.V., 2002. An MHC component to kin recognition and mate choice in birds: Predictions, progress and prospects. *The American Naturalist*, 160: S225-237.
- Zoorob R., Behar G., Kroemer G., Auffray C., 1990. Organisation of a functional chicken class II gene. *Immunogenetics*, 31: 179-187.

RINGRAZIAMENTI

Grazie davvero a tutti coloro che sia durante la fase sperimentale, sia per la stesura della tesi e sia per il sostegno morale, sono stati d'aiuto e disponibili ogni qualvolta ho avuto bisogno di un parere o di un incoraggiamento.

Grazie quindi a Lapo che è stato semplicemente determinante, ad Emma che mi ha aiutato ed alleviato nei momenti di scrittura, ad Angela, Elisa, Francesco, Marika e Patrizia per i "contributi" in corso di clonaggio; lo stesso vale per Emanuele Biondi e Francesco Pini. Un grazie anche a Massimone e Alberto De marco che mi hanno convinto e incoraggiato ad intraprendere questi 3 anni di studio. Grazie anche a "The Director" Roberto che mi ha appoggiato nella decisione di puntare al Dottorato nonostante poi i ripetuti richiami... Grazie alla Magne e all'Amman per gli aiuti diretti ed indiretti e anche alla Blondye e a tutti gli amici che ho trascurato negli ultimi tempi ma che hanno capito... grazie quindi anche alla mia Ila!. Voglio anche menzionare ,perché no, el Dieghito, il Biancovič, l'Annina e la Giulietta con cui mi son potuto distrarre e rilassare ogni volta che ne ho avuto davvero bisogno a causa anche di questo lavoro... Infine grazie come sempre a Mammà e a Babbo Fulvio che mi sono sempre vicini.

